

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



CARACTERIZAÇÃO DAS INFEÇÕES POR LEPTOSPIRA SPP. EM CÃES INTERNADOS NA
UNIDADE DE ISOLAMENTO E CONTENÇÃO BIOLÓGICA DO HOSPITAL ESCOLAR DA
FMV-ULISBOA NO PERÍODO DE 2013-2019

DANIELA FILIPA BARRELA REBELO

ORIENTADOR:
Doutor Virgílio da Silva Almeida

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



CARACTERIZAÇÃO DAS INFEÇÕES POR LEPTOSPIRA SPP. EM CÃES INTERNADOS NA
UNIDADE DE ISOLAMENTO E CONTENÇÃO BIOLÓGICA DO HOSPITAL ESCOLAR DA
FMV-ULISBOA NO PERÍODO DE 2013-2019

DANIELA FILIPA BARRELA REBELO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil Neves

ORIENTADOR:

Doutor Virgílio da Silva Almeida

VOGAIS:

Doutor Virgílio da Silva Almeida
Doutor Rodolfo Assis Oliveira Leal

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Daniela Filipa Barreira Rebelo

Título da Tese ou Dissertação: Caracterização das infeções por *Leptospira* spp. em cães internados na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica do Hospital Escolar da FMV-ULisboa no período de 2013-2019

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de
Mestrado ou de

Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☒ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 03 de março de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura:

Daniela Filipa Barreira Rebelo

Agradecimentos

A toda a minha família, especialmente aos meus pais, à minha irmã Joana, ao meu namorado Eduardo, aos meus avós, ao meu primo João e aos meus tios por todo o carinho e apoio que me deram durante esta fase da minha vida, sem vocês teria sido muito mais difícil concluir esta etapa.

Aos meus amigos, em especial às minhas amigas de curso Maria Teixeira e Margarida Plácido que estiveram sempre presentes durante estes 6 anos nos momentos mais difíceis, obrigada pelo vosso apoio e amizade.

Ao Professor Doutor Virgílio da Silva Almeida por toda a ajuda, disponibilidade, conhecimento e por ter aceite ser meu orientador.

Ao Professor Telmo Nunes pela sua disponibilidade e ajuda na análise estatística.

A todos os Médicos, Enfermeiros e Auxiliares Veterinários que acompanharam o meu Estágio Curricular, no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, obrigada por terem contribuído para a minha formação profissional.

A toda a equipa da Unidade de Isolamento e Contenção biológica, obrigada por possibilitarem que os últimos três meses do meu estágio curricular fossem tão produtivos. Em especial à Dra. Inês Machado pela sua disponibilidade, simpatia, pela partilha da base de dados e dos seus conhecimentos e à Professora Doutora Solange Gil pela sua simpatia, disponibilidade e por todos os conhecimentos transmitidos durante o meu estágio curricular.

Aos meus colegas estagiários, em especial à Alejandra Olim, Rita Diogo, Viviana Santos, Raquel Veloso, Filipe Barão, Pilar Rocha e Márcia Catana, obrigada pela vossa boa disposição e por todo o apoio.

Caracterização das infecções por *Leptospira spp.* em cães internados na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica do Hospital Escolar da FMV-ULisboa no período de 2013-2019

Resumo

Os objetivos deste estudo consistiram em identificar possíveis fatores de risco, indicadores de prognóstico e de fatores que pareceram afetar o tempo de hospitalização, através da descrição epidemiológica, dos métodos de diagnóstico, da terapêutica, e das alterações clínicas, laboratoriais e imagiológicas, em cães positivos a leptospirose e internados na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica do Hospital Escolar (UICB). Foram consultados os históricos médicos de 150 cães, com sintomatologia compatível com leptospirose, dos quais 55 eram positivos a leptospirose e os restantes 95 eram negativos, estando todos eles hospitalizados na UICB, de dezembro de 2013 a dezembro de 2019.

A maioria dos cães foram diagnosticados a partir da serologia IgM (96,4%), e em nenhum dos casos foi realizado o MAT. Os sinais clínicos mais frequentes foram: o vômito (72,7%), a anorexia (50,9%), a diarreia (40,0%) e a hematúria (40,0%). As alterações analíticas mais frequentes no hemograma e bioquímicas foram: o aumento da AST (100%), o aumento da bilirrubina total (81,8%), o aumento da ureia (70,6%) e da creatinina (69,2%), a leucocitose com neutrofilia (68,0%), o aumento da ALT (55,1%) e a trombocitopenia (51,3%).

Relativamente ao ionograma e urianálise, as principais alterações foram: a proteinúria (94,7%), a hematúria (73,7%), a hipocloremia (63,2%) e a hiponatremia (52,6%). Na ecografia abdominal, verificaram-se com maior frequência: a hepatomegália (47,2%), a hipoecogenicidade hepática (38,9%), a hiperecogenicidade do córtex renal (25,0%), a esplenomegália (25,0%), as lamas biliares (22,2%) e a perda da transição cortico-medular (16,7%). Na radiografia torácica, verificou-se na maioria dos casos um padrão intersticial não estruturado (27,8%) e um padrão interstício-alveolar (11,1%).

Os antibióticos mais utilizados foram a ampicilina (69,1%) e a doxiciclina (65,5%), e verificou-se uma taxa de sobrevivência de 50,9%.

Concluiu-se que os fatores de risco para a ocorrência de leptospirose, foram o facto de os cães serem adultos (entre os 2 e os 7 anos) e a ocorrência de uma maior precipitação (mais casos no inverno), e como fatores de proteção as cadelas estarem esterilizadas, os cães apresentarem uma idade igual ou superior a 8 anos e uma menor precipitação (menos casos no verão). Verificou-se um pior prognóstico em cães: seniores, hipotérmicos, oligoanúricos e com a ureia e/ou a creatinina aumentadas. Apenas a neutrofilia afetou o tempo para a ocorrência de alta (duração da hospitalização).

Palavras-chave: Leptospirose canina, Insuficiência renal, Doxiciclina, Zoonose, Insuficiência hepática.

Characterization of infections by *Leptospira spp.* in dogs admitted to the Biological Containment and Isolation Unit of the Teaching Hospital of FMV-ULisboa in the period 2013-2019

Abstract

The objectives of this study were to identify possible risk factors, prognostic indicators, and factors that seemed to affect the length of hospital stay, through the epidemiological description, the diagnostic methods, the therapy, and the clinical, laboratory and imaging changes, in dogs positive for leptospirosis and admitted to the Biological Containment and Isolation Unit of the Teaching Hospital (BCIU). The medical histories of 150 dogs were consulted, with symptoms compatible with leptospirosis, of which 55 were positive for leptospirosis, and the remaining 95 were negative, all of whom were hospitalized at BCIU, from December 2013 to December 2019.

Most dogs were diagnosed using IgM serology (96.4%) and MAT was not performed in any of the cases. The most frequent clinical signs were: vomiting (72.7%), anorexia (50.9%), diarrhea (40.0%) and hematuria (40.0%). The most frequent analytical changes in the blood count and biochemistry were: increased AST (100%), increased total bilirubin (81.8%), increase in urea (70.6%) and creatinine (69.2%), leukocytosis with neutrophilia (68.0%), increased ALT (55.1%) and thrombocytopenia (51.3%).

Regarding ionogram and urinalysis, the main changes were: proteinuria (94.7%), hematuria (73.7%), hypochloremia (63.2%) and hyponatremia (52.6%). Abdominal ultrasound showed more frequently: hepatomegaly (47.2%), hepatic hypoechogenicity (38.9%), renal cortex hyperechogenicity (25.0%), splenomegaly (25.0%), bile sludge (22.2%) and the loss of the cortico-medullary transition (16.7%). In chest radiography, in most cases there was an unstructured interstitial pattern (27.8%) and an interstitial-alveolar pattern (11.1%).

The most widely used antibiotics were ampicillin (69.1%) and doxycycline (65.5%) and a survival rate of 50.9% was verified.

It was concluded that the risk factors for the occurrence of leptospirosis were the fact that the dogs are adults (between 2 and 7 years old) and the occurrence of greater precipitation (more cases in winter), and as factors of protection females are sterilized, dogs are 8 years old or older, and less precipitation (less cases in summer). There was a worse prognosis in dogs: seniors, hypothermic, oligoanuric, and with increased urea and / or creatinine. Only neutrophilia affected the time to discharge (duration of hospitalization).

Key-Words: Canine leptospirosis, Renal failure, Doxycycline, Zoonosis, Liver failure.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Lista de figuras	vii
Lista de gráficos	vii
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	x
1. Descrição das atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular	1
1.1 Medicina Geral.....	1
1.2 Medicina Interna.....	1
1.3 Oftalmologia.....	1
1.4 Oncologia.....	2
1.5 Dermatologia.....	2
1.6 Cirurgia.....	2
1.7 Radiologia.....	2
1.8 Ecografia.....	3
1.9 Internamento Geral.....	3
1.10 Unidade de Isolamento e Contenção Biológica	3
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1 Etiologia	4
2.2 Epidemiologia.....	5
2.3 Patogénese e sinais clínicos	7
2.4 Diagnóstico	9
2.4.1 Alterações analíticas	9
2.4.2 Imagiologia.....	11
2.4.3 Diagnóstico definitivo	11
2.4.3.1 Microscopia em fundo escuro	12
2.4.3.2 Biópsia dos tecidos	12
2.4.3.3 Cultura bacteriana.....	12
2.4.3.4 PCR	12
2.4.3.5 Teste de aglutinação microscópica (MAT).....	13
2.4.3.6 ELISA- Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.....	15
2.4.3.7 Testes rápidos de imunocromatografia e ELISA.....	16
2.4.4 Achados patológicos.....	18
2.5 Tratamento	19

2.5.1 Antibioterapia	19
2.5.2 Tratamento da insuficiência renal aguda.....	19
2.5.3 Tratamento das hepatopatias.....	20
2.5.4 Tratamento da Síndrome Pulmonar Hemorrágica Leptospiral	21
2.5.5 Tratamento das alterações hemorrágicas	21
2.6 Resposta ao tratamento e acompanhamento clínico após a recuperação	22
2.7 Prognóstico.....	22
2.8 Prevenção	23
2.8.1 Imunidade e vacinação	23
2.9 Saúde Pública.....	25
3. Estudo.....	28
3.1 Objetivos	28
3.2 Material e métodos	28
3.2.1 População em estudo.....	28
3.2.2 Fontes de dados e análise estatística.....	28
3.2.3 Critérios de inclusão e métodos de diagnóstico	29
3.2.4 Anamnese e exame físico	29
3.2.5 Exames complementares de diagnóstico.....	30
3.2.6 Terapêutica.....	30
3.2.7 Vacinação	30
4. Resultados	31
4.1 Descrição da população de cães internados na UICB	31
4.1.1 Género	31
4.1.2 Idade	32
4.1.3 Porte e peso	35
4.1.4 Raça	36
4.1.5 Estilo de vida	37
4.1.6 Número de animais coabitantes.....	38
4.1.7 Vacinação	38
4.1.8. Casos referenciados.....	40
4.1.9. Duração do internamento.....	40
4.1.10. Distribuição geográfica	42
4.1.11. Distribuição mensal e anual dos casos de leptospirose.....	43
4.1.12. Tipo de teste laboratorial usado no diagnóstico	44
4.1.13. Sinais clínicos.....	44
4.1.14. Exames complementares.....	48

4.1.14.1. Hemograma	48
4.1.14.2. Ionograma.....	49
4.1.14.3. Análises bioquímicas.....	50
4.1.14.4. Urianálise	53
4.1.14.5 Ecografia abdominal	53
4.1.14.6 Radiografia torácica.....	54
4.1.15. Tratamento.....	55
4.1.16. Doenças concomitantes.....	56
4.1.17. Desfecho clínico.....	56
4.1.18. Seguimento.....	57
5. Discussão.....	57
5.1 Fatores de risco	57
5.2 Diagnóstico	59
5.3 Indicadores de prognóstico.....	61
5.4 Sinais clínicos	62
5.5 Hemograma	64
5.6 Bioquímicas e ionograma.....	65
5.7. Urianálise.....	65
5.8. Imagiologia.....	66
5.9. Duração do internamento.....	68
5.10 Terapêutica.....	68
6. Conclusões	71
7. Referências Bibliográficas.....	74
Anexos	81
Anexo 1- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson ou do teste exato de Fisher (valores de p).....	81
Anexo 2- Resultados do Log rank test (valor de p), para comparação das curvas de Kaplan-Meier.....	84
Anexo 3- Valores de p obtidos no teste da normalidade de Shapiro-Wilk, teste Wilcoxon (teste não paramétrico) e t-test para duas amostras independentes (teste paramétrico), para os valores absolutos do hemograma, ionograma e bioquímicas com o desfecho.	85

Lista de figuras

Figura 1- Fluxograma do diagnóstico laboratorial perante uma suspeita de leptospirose (Ettinger et al. 2017).....	15
--	----

Lista de gráficos

Gráfico 1- Distribuição da idade (anos), dos cães internados na UICB, de acordo com o diagnóstico. N=150.....	33
Gráfico 2- Distribuição da idade (anos), dos 55 cães positivos a leptospirose, internados na UICB, de acordo com o desfecho.	35
Gráfico 3 - Duração do internamento (em dias), e desfecho clínico dos cães infetados. N=55	40
Gráfico 4- Distribuição do número de dias de internamento nos cães infetados, de acordo com o desfecho clínico. N=55	41
Gráfico 5- Curvas Kaplan-Meier do número de dias até à alta clínica. 34 cães infetados com neutrofilia e 15 cães infetados sem neutrofilia.....	42
Gráfico 6- Frequência mensal e anual dos casos de leptospirose no período de estudo. N=55	43
Gráfico 7- Precipitação (mm) total mensal de 2014 a 2019. Estação Meteorológica de Lisboa do IPMA (www.ipma.pt).	44
Gráfico 8- Distribuição da temperatura rectal dos cães infetados, de acordo com o desfecho clínico. N=55.....	46
Gráfico 9- Distribuição dos valores da ureia (mg/dl), dos 55 cães positivos a leptospirose, internados na UICB de acordo com o desfecho	51
Gráfico 10- Distribuição dos valores da creatinina (mg/dl), dos 55 cães positivos a leptospirose, internados na UICB de acordo com o desfecho.	52

Lista de tabelas

Tabela 1- Serogrupos e serovares de <i>L. interrogans</i> e de <i>L. kirschneri</i> que afetam cães (Sykes 2014).....	4
Tabela 2- Hospedeiros reservatórios e serovares de <i>Leptospira</i> spp. (Bharti et al. 2003).	6
Tabela 3- Sensibilidade e especificidade dos testes Witness Lepto, SNAP Lepto e MAT (fase aguda) relativamente ao diagnóstico final com qPCR e/ou MAT. (Troia et al. 2018). ..	17
Tabela 4- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, de acordo com o género. N=150	31
Tabela 5- Distribuição dos cães machos, com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, internados na UICB, de acordo com a castração. N=78	31
Tabela 6- Distribuição das cadelas, com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, internadas na UICB, de acordo com a esterilização. N=72	32
Tabela 7- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo de leptospirose, de acordo com o género e o desfecho clínico. N=55	32
Tabela 8- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, de acordo com a idade. N=150.....	33
Tabela 9- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo a leptospirose, de acordo com a idade e o desfecho. N=55	34
Tabela 10- Média, mediana, máximo, mínimo e desvio padrão do peso dos cães infetados. N=55	35

Tabela 11- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo, de acordo com o porte e o desfecho clínico. N=50	36
Tabela 12- Raças de cães positivos a leptospirose (N=55)	36
Tabela 13- Distribuição dos cães, de acordo com a raça. N=150.....	37
Tabela 14- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo de leptospirose, de acordo com a raça e o desfecho clínico. N=55.....	37
Tabela 15- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, de acordo com o estilo de vida. N=150	38
Tabela 16- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, de acordo com coabitação com outro animal de companhia. N=150.....	38
Tabela 17- Tipo de vacina administrada nos cães infetados com leptospirose. N=40.....	39
Tabela 18- Distribuição dos cães, de acordo com a vacinação para a leptospirose. N=60...	39
Tabela 19- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo de leptospirose, de acordo com o estado vacinal contra a leptospirose e o desfecho clínico. N=26	40
Tabela 20- Sazonalidade da distribuição dos cães internados. N=150	43
Tabela 21- Sinais clínicos apresentados pelos cães infetados, recolhidos no dia da admissão e no internamento na UICB. N=55.....	45
Tabela 22- Distribuição dos sinais clínicos, apresentados pelos cães infetados, de acordo com o desfecho clínico. N=55	47
Tabela 23- Parâmetros de hemograma, realizados nos cães infetados.....	48
Tabela 24- Alterações no hemograma e desfecho clínico dos cães infetados. N=55	48
Tabela 25- Valores mínimo, máximo e média dos parâmetros do hemograma dos cães infetados. N=55.....	49
Tabela 26- Parâmetros de ionograma realizados nos cães infetados. N=55.....	49
Tabela 27- Distribuição dos cães infetados, de acordo com as alterações no ionograma e o desfecho clínico.	49
Tabela 28- Valor mínimo, máximo e média dos parâmetros do ionograma e desfecho clínico dos cães infetados. N=55.....	50
Tabela 29- Parâmetros de bioquímicas, realizadas no dia da admissão, a cães positivos a Leptospirose, internados na UICB.....	50
Tabela 30- Distribuição dos cães com leptospirose, internados na UICB, de acordo com as alterações nas análises bioquímicas e o desfecho.....	51
Tabela 31- Valor mínimo, máximo e média dos parâmetros de bioquímicas, realizados no dia da admissão, a cães positivos a Leptospirose, internados na UICB.....	52
Tabela 32- Distribuição dos cães positivos a leptospirose, de acordo com as alterações na urianálise e o desfecho.....	53
Tabela 33- Alterações na ecografia abdominal realizada em cães positivos a Leptospirose internados na UICB.....	54
Tabela 34- Distribuição dos cães positivos a leptospirose, de acordo com as alterações na ecografia abdominal e o desfecho.....	54
Tabela 35- Distribuição dos 18 cães positivos a leptospirose, de acordo com as alterações na radiografia torácica e o desfecho.	55
Tabela 36- Distribuição dos cães positivos a leptospirose, de acordo com o tratamento realizado e o desfecho.....	55
Tabela 37- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo a leptospirose de acordo com as doenças concomitantes. N=55	56
Tabela 38- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou teste exato de Fisher*, do género, idade, raça, nº de animais, estilo de vida, estatuto vacinal e estação do ano com o diagnóstico.....	81

Tabela 39- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou teste exato de Fisher*, do gênero, idade, porte, raça, tipo de consulta, estilo de vida e estatuto vacinal com o desfecho.	81
Tabela 40- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre os sinais clínicos e o desfecho.	82
Tabela 41- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre as alterações no hemograma e o desfecho.	82
Tabela 42- Resultados do teste exato de Fisher*, entre as alterações no ionograma e o desfecho.	83
Tabela 43- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre as alterações nas análises bioquímicas e o desfecho.	83
Tabela 44- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre as alterações na urianálise e o desfecho.	83
Tabela 45- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, entre as alterações na ecografia abdominal e o desfecho.	83
Tabela 46- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre as alterações no raio-X torácico e o desfecho.	84
Tabela 47- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre o tratamento realizado e o desfecho.	84
Tabela 48- Resultados do Log rank test (valor de p), para comparação das curvas de Kaplan-Meier, de forma a determinar como certos fatores, afetaram a ocorrência de alta, em um dia específico do internamento.	84
Tabela 49- Valores de p obtidos no teste da normalidade de Shapiro-Wilk.	85
Tabela 50- Valores de p obtidos no teste Wilcoxon.	85
Tabela 51- Valores de p obtidos no t-test para duas amostras independentes.	85

Lista de abreviaturas

ADN- Ácido desoxirribonucleico

ALT- Alanina aminotransferase

aPPT- Tempo de tromboplastina parcial ativada

AST- Aspartato aminotransferase

BCIU - Biological Containment and Isolation Unit of the Veterinary Teaching Hospital

CID- Coagulação intravascular disseminada

CK- Creatinina quinase

ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPI- Equipamentos de proteção individual

FAS- Fosfatase alcalina sérica

FeLV- Vírus da Leucemia Felina

FIV- Vírus da Imunodeficiência Felina

FMV- Faculdade de Medicina Veterinária

HE- Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária

IgG- Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M

IPMA- Instituto Português do Mar e da Atmosfera

LPS- Lipopolissacárido

MAT- Teste de aglutinação microscópica

µm- Micrómetro

PAAF- Punção aspirativa por agulha fina

PCR- *Polymerase chain reaction*

PT- Tempo de protrombina

Rácio UPC- Rácio proteína/creatinina urinárias

SRIS- Síndrome da resposta inflamatória sistémica

TAC- Tomografia Axial Computorizada

TRC- Tempo de repleção capilar

UICB- Unidade de Isolamento e Contenção Biológica do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária

ULisboa- Universidade de Lisboa

1. Descrição das atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular

O meu estágio curricular, foi realizado no Hospital Escolar (HE) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade de Lisboa (ULisboa). Teve a duração de 6 meses, com início no dia 2 de setembro de 2019 e término a 29 de fevereiro de 2020, num total de 1200 horas. Os primeiros três meses do estágio, de 2 de setembro de 2019 a 29 de novembro de 2019, foram divididos em rotações pelos seguintes serviços do HE: Medicina Geral; Medicina Interna; Oftalmologia; Oncologia; Dermatologia; Cirurgia; Radiologia; Ecografia e Internamento Geral, num total de 600 horas.

Os últimos três meses de estágio, de 2 de dezembro de 2019 a 29 de fevereiro de 2020, foram realizados na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica (UICB) do HE num total de 600 horas. Os turnos tinham a duração de 8 horas, com exceção do Internamento Geral, onde realizei turnos de 12 horas, em regime diurno (8h00 às 20h00) ou noturno (20h00 às 8h00). As atividades que realizei durante o estágio curricular foram sempre supervisionadas por um médico veterinário ou por um enfermeiro de serviço.

1.1 Medicina Geral

No serviço de Medicina Geral tive a oportunidade de participar em consultas, com ou sem marcação, algumas das quais de seguimento (*follow up*), onde foi possível realizar a anamnese, o exame físico, a lista de diagnósticos diferenciais e a seleção dos exames complementares de diagnóstico. Por vezes, era também necessário proceder a colheitas de sangue, escolher a terapêutica mais adequada para cada caso, preparar e administrar medicamentos. Muitas das consultas eram de vacinação, onde se avaliava o plano vacinal mais adequado para cada animal.

1.2 Medicina Interna

No serviço de Medicina Interna, acompanhei consultas, na grande maioria referenciadas, e com especial ênfase na Endocrinologia. Fiz a anamnese, o exame físico, a lista de diagnósticos diferenciais, discuti a seleção de exames complementares de diagnóstico e a terapêutica. Também participei na interpretação dos resultados analíticos de sangue e urina (hemograma, bioquímicas, urina tipo II, urocultura, etc.), e na redação de relatórios clínicos, com a discussão do caso clínico com o médico veterinário responsável.

1.3 Oftalmologia

Em Oftalmologia realizei o exame oftalmológico a cães e gatos para testar os reflexos oculares, medir a pressão intraocular, examinar o fundo do olho, realizar os testes de Schirmer e de fluoresceína. Tive a oportunidade de acompanhar cirurgias de resolução de cataratas uni

e bilaterais, enucleação e resolução de entrópion, como cirurgiã assistente, tendo colaborado na preparação pré-cirúrgica do paciente e na monitorização anestésica.

1.4 Oncologia

Em Oncologia para além de assistir a consultas, participei nas sessões de quimioterapia que incluíam receber e pesar os animais, colocar os cateteres intravenosos, colher sangue para realização de análises sanguíneas (de forma a avaliar se os animais estavam aptos para o tratamento), administrar os fármacos e monitorizar os animais durante o procedimento.

1.5 Dermatologia

Nas consultas de Dermatologia fiz tricogramas e raspagens de pele com posterior observação ao microscópio ótico, pesquisei dermatófitos com a lâmpada de Wood e fiz biópsias de pele e vídeo-otoscopia.

1.6 Cirurgia

No serviço de Cirurgia, participei na preparação pré-cirúrgica do paciente: exame físico; colocação de cateteres intravenosos; preparação e administração da pré-medicação; indução anestésica; entubação endotraqueal; tricotomia; assepsia; na preparação do material cirúrgico e dos aparelhos de monitorização anestésica. Realizei a monitorização anestésica dos animais, fui circulante e ajudante de cirurgião.

Por fim, também realizei a monitorização pós-cirúrgica dos animais, e prestei os cuidados pós-cirúrgicos necessários, tais como, a avaliação e o manejo da dor e a monitorização da temperatura corporal. Assisti essencialmente a ovariohisterectomias eletivas ou para resolução de piómetras, a orquiectomias eletivas, à resolução de torções gástricas, à remoção de corpos estranhos por enterotomia, à colocação do bypass ureteral subcutâneo em felídeos e a diversas cirurgias oncológicas para remoção de neoplasias (nodulectomias, mastectomias, mandibulectomia, enucleações, etc.).

1.7 Radiologia

Em Radiologia, auxiliei na contenção, posicionamento e sedação (quando necessária) dos animais para a realização de radiografias; na indução e monitorização anestésica, e na preparação e administração de líquido de contraste nos animais submetidos a Tomografia Axial Computorizada (TAC); participei na interpretação e elaboração de relatórios dos exames referidos.

1.8 Ecografia

No serviço de Ecografia participei na contenção dos animais, na interpretação das imagens e na redação dos respetivos relatórios. Assisti a uma ecografia cervical com punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de um nódulo, a ecografias abdominais com a realização de cistocentese para colheita de urina, a biópsias hepáticas, a ecocardiografias com colheita de líquido de derrames pleurais e do pericárdio e a uma PAAF ecoguiada de massas intratorácicas.

1.9 Internamento Geral

No serviço de Internamento Geral, realizei o exame físico e a monitorização de animais em estado crítico; prestei cuidados de higiene e de alimentação dos animais internados; procedi à lavagem e à desinfeção de feridas; fiz pensos; preparei e administrei medicações por via oral, parentérica ou tópica; coloquei cateteres intravenosos; medi a glicemia, realizei colheitas de sangue para hemograma, análises bioquímicas e provas de coagulação; fiz colheitas de urina por cistocentese ou por algaliação para análise de urina tipo II e urocultura; preparei os sistemas de fluidoterapia, calculei as taxas de fluidoterapia, algaliei cães e gatos em sistema fechado e medi a pressão arterial. Tive ainda a oportunidade de assistir à passagem de casos na troca de turnos entre os médicos veterinários, onde se discutiam os casos clínicos, e a sua abordagem diagnóstica e terapêutica.

1.10 Unidade de Isolamento e Contenção Biológica

Na UICB apliquei conhecimentos de proteção individual e ambiental, de forma a evitar a transmissão e a propagação de doenças infecciosas, algumas zoonóticas. Participei nos procedimentos descritos anteriormente para o Internamento Geral, mas com a utilização de equipamentos de proteção individual (touca, máscara, luvas, bata descartável e protetores de sapatos), e com desinfeção de todo o material utilizado no exame físico. No início de cada turno, realizei desinfeções das superfícies das diferentes salas e procedi à colheita de amostras biológicas dos animais internados para o biobanco da unidade (soro sanguíneo, urina, zaragatoas retais e oronasais), participei em consultas de doenças infecciosas e na discussão de diagnósticos diferenciais e de abordagens terapêuticas. Acompanhei gatos infetados com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou com vírus da leucemia felina (FeLV), com o parvovírus felino, calicivírus e infeções bacterianas multirresistentes; e cães com leptospirose, parvovirose e infeções bacterianas multirresistentes.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Etiologia

A Leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, responsáveis por uma infecção sistêmica. A *Leptospira spp.* é uma espiroqueta fina (0,1 µm de diâmetro), flexível, móvel, em forma de espiral, que termina em gancho na extremidade, o que a diferencia das restantes espiroquetas (Sykes 2014; Faine et al. 1999 citado por Schuller et al. 2015). É uma espiroqueta aeróbia obrigatória, que partilha características comuns com bactérias Gram positivas e Gram negativas (Goldstein 2010).

Originalmente o gênero *Leptospira* foi classificado em duas espécies: *Leptospira interrogans* sensu lato (estirpes patogênicas) e *L. Biflexa* sensu lato (estirpes não patogênicas); e subclassificado em serovares. Esta classificação foi baseada no fenótipo das espiroquetas e nas suas características de crescimento e de patogenicidade (Faine et al. 1999 citado por Schuller et al. 2015). Estão reconhecidos mais de 250 serovares diferentes de *Leptospira spp.* patogênicos, que são distinguidos por diferenças no antígeno O do lipopolissacarídeo (LPS). Dez destes serovares causam doença em cães (Sykes 2014). Os serovares estão ainda agrupados em mais de vinte serogrupos, antigenicamente relacionados e podem levar a reações cruzadas nos métodos de diagnóstico laboratoriais que detetam anticorpos específicos (Greene et al. 2012; Sykes 2014).

Recentemente, uma classificação genotípica baseada na hibridização do ácido desoxirribonucleico (ADN), estabeleceu 20 espécies de *Leptospira*, das quais 9 são patogênicas, 6 saprófitas e 5 intermediárias (Schuller et al. 2015). Nos cães, a leptospirose é causada por duas espécies patogênicas: a *Leptospira interrogans* e a *Leptospira kirschneri* (Sykes 2014).

Tabela 1- Serogrupos e serovares de *L. interrogans* e de *L. kirschneri* que afetam cães (Sykes 2014).

Espécie	Serogrupo	Serovar	Hospedeiros reservatórios	País
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Ratos	EUA, França
	Canicola	Canicola	Cães	Índia, EUA
	Pomona	Pomona	Cavalos, vacas, leões marinhos	EUA
	Australis	Bratislava	Porcos, ouriços, cavalos	EUA
	Sejroe	ND	Ratos	Alemanha
	Ballum	Ballum	Ratos, gambá, esquilos cinzentos, rato almiscarado	EUA
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Guaxinins, esquilo raposa, ratos almiscarados, línex, ratos, ratazanas, vacas, cavalos	EUA

Para identificar as diferentes estirpes de *Leptospira spp.*, tem sido utilizado o teste de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), com tipificação do ADN (Sykes 2014). Esta nova classificação com base no genótipo está a revelar-se mais ajustada para diferenciar as manifestações clínicas da doença e os hospedeiros reservatórios, do que o método de classificação clássico por serovares (Zuerner and Alt 2009; Timoney et al. 2011).

2.2 Epidemiologia

A Leptospirose pode ser transmitida entre os hospedeiros por contacto direto, ou mais frequentemente por contacto indireto. A transmissão por contacto direto ocorre por via venérea, placentária, mordedura, ingestão de tecidos de animais infetados, ou quando urina contaminada contacta com as membranas mucosas ou feridas da pele. A transmissão por contacto indireto, ocorre através da exposição de animais suscetíveis ao solo, à água e/ou a alimento contaminado (Greene et al. 2012).

As espécies patogénicas de *Leptospira spp.* não se replicam fora do hospedeiro, e são rapidamente inativadas no meio ambiente quando expostas a calor excessivo, à radiação ultravioleta, a certos desinfetantes e à congelação (Sykes 2014). Contudo, quando as condições ambientais são ótimas, as espécies patogénicas de *Leptospira spp.* sobrevivem durante semanas a meses na água e em solos húmidos (Zaitsev et al. 1989 citado por Sykes 2014).

A água morna estagnada ou em movimento lento é um habitat adequado para as leptospiros, onde forma biofilmes em superfícies orgânicas e inorgânicas (*waterborne disease*). A sobrevivência no solo, é favorecida por uma temperatura ambiente entre os 0º e os 25º C e um pH neutro ou ligeiramente alcalino. Em urina ácida não diluída (pH 5-5,5), as espiroquetas apenas sobrevivem transitoriamente (Greene et al. 2012).

Em alguns estudos, os fatores de risco associados a casos de leptospirose canina, incluem: a exposição a fontes de água ambientais; machos não castrados; cães de grande porte; faixa etária entre os 4 e os 10 anos; cães de caça ou trabalho (Adin and Cowgill 2000; Ward et al. 2002; Ward et al. 2004; Sykes 2014). Porém, outros estudos epidemiológicos, encontraram seroprevalências similares quer em cães de porte pequeno como de grande porte, de todas as faixas etárias e de ambos os géneros, o que sugere que cães de qualquer idade e raça, estão em risco de infeção (Rentko et al. 1992; Stokes et al. 2007; Gautam et al. 2010).

A leptospirose é mais prevalente em zonas do mundo, onde a precipitação é maior e o clima quente, mas a presença de hospedeiros reservatórios infetados influencia muito a distribuição geográfica da doença (Sykes 2014).

Nas infeções causadas por *Leptospira spp.*, considera-se a existência de dois tipos de hospedeiros: de manutenção ou definitivos e acidentais. Cada serovar está adaptado a um ou

mais mamíferos, designados de hospedeiros definitivos ou de manutenção. Os hospedeiros acidentais, são infectados por serovares específicos, que não estão adaptados a viver de forma crónica nessa espécie, por isso os hospedeiros acidentais tendem a desenvolver doença clínica, muitas vezes grave, e raramente se tornam portadores crónicos (Goldstein 2010).

Os hospedeiros de manutenção, selvagens ou domésticos, geralmente não exibem sinais clínicos após se infectarem, mas podem alojar as leptospiros nos túbulos renais, por períodos de tempo prolongados (meses a anos), sendo as leptospiros excretadas para o meio ambiente através da urina, e promovendo desta forma o contágio de hospedeiros acidentais, seja por contato direto ou indireto (Schuller et al. 2015). O cão só é hospedeiro de manutenção da *Leptospira interrogans* serovar canicola (Goldstein 2010).

Os pequenos roedores, são os hospedeiros de manutenção mais importantes na transmissão da doença ao cão, ao Homem e às espécies pecuárias (Levett 2001; Schuller et al. 2015).

Os animais podem ser hospedeiros de manutenção de certos serovares e hospedeiros acidentais de outros serovares, apresentando normalmente neste último caso, um quadro clínico grave ou até mesmo fatal (Levett 2001).

A leptospirose é uma doença de ocorrência sazonal, estando os surtos epidémicos em humanos e nos animais, associados a chuvas fortes e a inundações (Ward 2002).

A leptospirose canina, foi descrita pela primeira vez em 1899, e até 1960 acreditava-se que a *Leptospira interrogans* serovares icterohaemorrhagiae e canicola, eram os principais responsáveis pelos casos de leptospirose canina (Goldstein 2010). Os principais serogrupos isolados de cães no continente europeu são: Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Australis, Sejroe e Canicola (Ellis 2010); mas são necessários mais estudos para esclarecer quais são os serovares que mais frequentemente causam doença em cães (Reagan and Sykes 2019).

Tabela 2- Hospedeiros reservatórios e serovares de *Leptospira* spp. (Bharti et al. 2003).

Hospedeiros reservatórios	Serovares adaptados ao hospedeiro
Porco	Pomona, Tarassovi
Vaca	Hardjo, Pomona
Cavalo	Bratislava
Cão	Canicola
Ovelha	Hardjo
Ratazana	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Rato	Ballum, Arborea, Bim
Morcego	Cynopteri, Wolffi

2.3 Patogénese e sinais clínicos

Após invadirem o hospedeiro, as leptospiiras patogénicas rapidamente estabelecem uma infeção sistémica por via hematogénea, disseminam-se e replicam-se nos tecidos de vários órgãos como os rins, o fígado, o baço, o sistema nervoso central, os olhos e no trato genital (Greene et al. 2012; Sykes 2014; Schuller et al. 2015).

Geralmente esta fase de leptospiremia tem a duração média de dez dias, seguindo-se a fase de leptospirúria, de duração variável, dependendo da resposta imunitária do hospedeiro infetado e da estirpe infetante (Greenlee et al. 2005; Schuller et al. 2015). As leptospiiras condicionam a resposta do sistema imunitário do hospedeiro, ao ligarem na sua superfície, inibidores de ativação do complemento (Meri et al. 2005; Barbosa et al. 2009).

As espiroquetas podem produzir uma grande variedade de toxinas, incluindo fosfolipases, esfingomielinases e proteínas formadoras de poros (Sykes 2014). Nos primeiros dias da infeção, como resultado de uma lesão endotelial aguda, pode ocorrer edema dos tecidos e coagulação intravascular disseminada (Greene et al. 2012).

A colonização renal ocorre na maioria dos cães infetados experimentalmente (Klaasen et al. 2003). As leptospiiras persistem e multiplicam-se no epitélio dos túbulos renais, induzindo a libertação de citocinas, o recrutamento de células inflamatórias e causando nefrite aguda. A nefrite intersticial nos cães pode ser uma manifestação crónica, como consequência de um episódio agudo de doença (Goldstein 2010). No fígado pode ocorrer necrose centrolobular e oclusão dos ductos e dos canálculos biliares, que podem causar icterícia (Goldstein 2010).

A resposta imunitária do hospedeiro, é um fator importante, uma vez que a exposição prévia (natural ou vacinal) ao mesmo serovar, desencadeia algum grau de imunidade. Contudo, a duração da imunidade após a infeção natural, e o grau de proteção cruzada entre os diferentes serovares, é desconhecida no cão (Goldstein 2010).

Três situações distintas podem ser observadas, consoante o título de anticorpos do hospedeiro contra a *Leptospira* spp. Se o título de anticorpos estiver ausente ou for baixo, há multiplicação bacteriana (leptospiremia) com danos vasculares, trombocitopenia, coagulopatias, insuficiência renal e hepática, que podem culminar na morte do animal (Greene et al. 2012). Se o sistema imunitário responder de forma eficaz com a produção de anticorpos, há eliminação das bactérias da corrente sanguínea e dos tecidos, mas em alguns casos, as leptospiiras podem persistir nos túbulos renais e ser excretadas na urina (leptospirúria) (Levett 2001; Greene et al. 2012). Se o título de anticorpos for moderado, a leptospiremia vai ser limitada, os sinais clínicos inaparentes ou discretos e as bactérias são eliminadas do rim sem excreção na urina. Se o cão estiver vacinado para a estirpe em causa, o título de anticorpos

vai ser elevado ou adequado, as bactérias serão eliminadas e não se observam sinais clínicos (Greene et al. 2012).

Nos casos de leptospirose aguda, o período de incubação é em média de 7 dias, dependendo da quantidade de bactérias à qual o cão foi exposto, da virulência da estirpe e da qualidade da resposta do sistema imunitário (Greenlee et al. 2005). Os sinais clínicos podem variar de muito ligeiros, como por exemplo, apenas febre ligeira, a quadros com graves alterações renais, hepáticas e pulmonares (Goldstein 2010).

A dinâmica da infecção pode ser hiperaguda, aguda, subaguda ou crónica (Greene et al. 2012) dependendo da idade do cão, da sua resposta imunitária, da dose e da virulência da leptospira (Levett 2001).

Nas infeções hiperagudas (em menos de 24 horas), ocorre uma leptospiremia massiva e morte com poucos sinais premonitórios (Greene et al. 2012; Adler and Klaasen 2015). A vasculite e o edema dos tecidos, podem conduzir a desordens hemorrágicas, características da Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica (SRIS) associada com sépsis. Os LPS da *Leptospira spp.* estimulam a aderência dos neutrófilos e a ativação das plaquetas, o que pode contribuir para as alterações inflamatórias e da coagulação referidas (Greene et al. 2012).

Nas infeções agudas (1-2 dias), é comum observar-se pirexia (39,5^o-40^o), tremores e fraqueza muscular (Greene et al. 2012; Adler and Klaasen 2015). Posteriormente, pode surgir vômito, desidratação, taquipneia, pulso rápido e irregular, diminuição da perfusão dos capilares, defeitos na coagulação e danos vasculares como hematémese, hematoquézia, melena, epistáxis, hematúria e petéquias (Greene et al. 2012; Schuller et al. 2015). Nos estadios terminais da infecção aguda, os cães apresentam-se muito prostrados, hipotérmicos e a insuficiência renal e hepática não têm tempo para se desenvolver (Greene et al. 2012).

As infeções subagudas (2-7 dias), caracterizam-se por insuficiência renal e hepática aguda, associadas aos seguintes sinais clínicos: anorexia, relutância ao movimento, vômito, diarreia, desidratação, polidipsia, palpação abdominal dolorosa (os rins podem estar ligeiramente aumentados à palpação), mucosas congestionadas, tosse, dispneia, conjuntivite, rinite, tonsilite e a temperatura retal pode estar dentro dos limites de referência normais (Greene et al. 2012; Adler and Klaasen 2015). Os cães podem apresentar hiperestesia paraespinal, por inflamação renal, muscular ou das meninges (Greene et al. 2012). Ocorre uma perda progressiva da função renal, com oligúria ou anúria. Caso o cão sobreviva, a função renal pode ser recuperada em 2 a 3 semanas ou poderá persistir uma doença renal crónica. A alteração hepática mais frequente é a icterícia. A hepatite pode levar a colestase intra-hepática, com alteração na cor das fezes, que poderão ficar acinzentadas (Greene et al. 2012). As alterações respiratórias, por exemplo taquipneia e dispneia, podem resultar de edema pulmonar por fluidoterapia excessiva, pneumonia aspirativa, dor ou acidose. Contudo, deve-se sempre considerar como possível causa de dispneia, a Síndrome de Hemorragia

Pulmonar Leptospiral, na qual os cães desenvolvem uma hemorragia intra-alveolar multifocal, que pode evoluir rapidamente, e levar a uma hemoptise massiva com insuficiência respiratória (Schuller et al. 2015). A pancreatite parece ser uma sequela das infecções por *Leptospira spp.*, e pode explicar o desconforto à palpação abdominal e a persistência de anorexia e vômito, em cães que recuperaram da azotemia após a hospitalização (Greene et al. 2012). As invaginações intestinais, estão também descritas como uma complicação nos casos agudos de leptospirose, possivelmente associadas à inflamação gastrointestinal e a desordens da motilidade intestinal como íleus paralítico (Schweighauser et al. 2009). As alterações cardíacas, estão também descritas em cães e humanos com leptospirose, nomeadamente taquiarritmias ventriculares e aumento na concentração de troponina sérica sugestiva de lesão do miocárdio (Mastorilli et al. 2007). Apesar da meningite asséptica estar descrita em 25% dos humanos com leptospirose, em cães não estão reportados casos de meningite ou meningoencefalite associados a infecção por leptospirose (Levett 2001; Schuller et al. 2015). Estão ainda descritas diferentes alterações oftalmológicas em cães com leptospirose, como o aumento da produção lacrimal, o corrimento ocular mucopurulento, a redução do reflexo pupilar, a conjuntivite, a panuveíte, o hifema, o papiledema, os descolamentos e as hemorragias da retina (Martins et al. 1998; Townsend et al. 2006). Finalmente, estão relatados alguns casos de desordens reprodutivas em cães infetados com leptospirose (Schuller et al. 2015), com o aborto e a infertilidade associados ao serovar Bratislava (Ellis 1986).

Os cães que sobrevivem à fase aguda da doença, podem não recuperar totalmente e apresentar sinais clínicos de doença renal e/ou hepática crônica, como inapetência, perda de peso, poliúria, polidipsia, ascite, icterícia ou encefalopatia hepática (Greene et al. 2012).

Goldstein et al. (2006) realizaram um estudo, com o objetivo de investigar se o serogrupo infetante, influenciava os sinais clínicos dos cães com leptospirose, e verificaram apenas pequenas diferenças clinicamente relevantes entre os diferentes serogrupos. Contudo, cães infetados com o serogrupo Pomona, parecem sofrer mais de vômito, trombocitopenia, azotemia grave e hiperfosfatemia (insuficiência renal grave), e têm uma menor probabilidade de sobrevivência do que cães infetados com outros serogrupos.

2.4 Diagnóstico

2.4.1 Alterações analíticas

O hemograma de cães com leptospirose pode apresentar como alterações a neutrofilia (por vezes com desvio à esquerda), a anemia não regenerativa, a linfopenia e/ou a trombocitopenia (Sykes 2014).

As causas de trombocitopenia ainda não estão bem esclarecidas, mas pensa-se que poderá ser devido a CID, à ativação das plaquetas e agregação, ao sequestro das plaquetas em casos de esplenomegalia ou a mecanismos imunomediados que induzam destruição

plaquetária (Davenport et al. 1989; Kohn et al. 2010; Sykes 2014). A anemia pode ser devida à hemólise, à perda de sangue no trato gastrointestinal devido à uremia, a uma hemorragia pulmonar ou por inibição da hematopoiese na sequência da resposta inflamatória (Bernheimerl and Bey 1986; Thompson and Manktelow 1986; Lee et al. 2002; Greene et al. 2012).

As alterações nas análises bioquímicas, variam dependendo das estirpes que circulam numa região geográfica, em particular. Deve-se suspeitar de leptospirose sempre que um cão apresente azotemia concomitantemente com um aumento das enzimas hepáticas, e principalmente, nos casos em que também ocorra trombocitopenia (Sykes 2014). Geralmente os cães infectados, apresentam um aumento leve a moderado da alanina aminotransferase (ALT), da aspartato aminotransferase (AST), da fosfatase alcalina sérica (FAS) e da concentração total de bilirrubina. É raro apresentarem aumento das enzimas hepáticas sem azotemia associada. Nalguns casos, a creatinina quinase (CK) pode estar bastante aumentada, devido a miosite (Sykes 2014).

Outras alterações, documentadas na maioria dos cães investigados por vários autores são a hipoalbuminemia, a hiponatremia, a hipocloremia e a hiperfosfatemia. A lipase pancreática sérica (PLI) pode também estar aumentada devido a pancreatite (Sykes 2014). A hipocalcemia pode ser por perdas a nível renal e/ou gastrointestinal, ou devida a uma glicoproteína leptospiral, que inibe a expressão e a função da sódio-potássio-adenosina trifosfato (Na⁺-K⁺-ATPase) tubular (Rentko et al. 1992; Wu et al. 2004; Goldstein et al. 2006; Mastorilli et al. 2007).

A urinálise tende a revelar isostenúria, mas também estão descritos casos de hipostenúria (Mastorilli et al. 2007). Podem ainda confirmar-se as seguintes alterações: glicosúria (secundária a lesões tubulares agudas); hematúria; piúria; cilindros hialinos (Mastorilli et al. 2007). A maioria dos cães apresenta proteinúria, o que é consistente com lesão glomerular e tubular, pois a eletroforese revela que é constituída por proteínas de elevado e baixo peso molecular, respetivamente (Mastorilli et al. 2007). Contudo, a lesão glomerular não é uma patologia primária da leptospirose, em que predominantemente ocorre nefrite tubulointersticial (Greene et al. 2012).

Várias alterações nos parâmetros hemostáticos, estão descritas em cães com episódios agudos de leptospirose, podendo ocorrer hipercoagulabilidade ou hipocoagulabilidade. Estão descritas concentrações de fibrinogénio aumentadas em 75% dos cães, o que é consistente com uma resposta de fase aguda (Mastorilli et al. 2007). O aumento da concentração dos D-dímeros e dos produtos de degradação do fibrinogénio, com uma diminuição da atividade da antitrombina, também estão descritos (Sykes 2014). Kohn et al. (2010) encontraram 14% dos cães com trombocitopenia, aumento no tempo de protrombina (PT) e no tempo da tromboplastina parcial ativada (aPPT), que indicaram a suspeita de CID.

2.4.2 Imagiologia

Estão descritas alterações na TAC e nas radiografias torácicas, em cães com leptospirose, na região caudo-dorsal dos pulmões, que variam de um padrão intersticial leve, a um padrão reticulo-nodular grave com infiltrados alveolares focais (Baumann 2001). Podem também estar presentes ligeiros derrames pleurais e/ou do mediastino (Gendron et al. 2014).

Sonet et al. (2017) estudaram as alterações mais frequentes na ecografia abdominal de 35 cães diagnosticados com leptospirose. A nível renal, as principais alterações encontradas foram o aumento da ecogenicidade do córtex renal e medular, a diminuição da transição cortico-medular, o espessamento cortical, a renomegália, a dilatação da pélvis renal, e o sinal medular. No fígado e na vesícula biliar descrevem o parênquima hepático difusamente hipoecogenico, hepatomegália, lamas biliares, espessamento da parede da vesícula biliar, mucocelo biliar e a parede da vesícula biliar hiperecogénica. No baço reportaram esplenomegalia, parênquima heterogéneo e nódulos no parênquima esplénico. Encontraram ainda derrames peri-renais e peritoneais, espessamento da parede gástrica e da parede intestinal, linfadenopatia e invaginação intestinal. Não identificaram nenhuma associação entre os serogrupos e a presença de alterações ecográficas, e em todos os cães, verificou-se a existência de pelo menos uma alteração ecográfica. Segundo os autores, a presença de um mucocelo biliar, parece ser um sinal de leptospirose em cães.

2.4.3 Diagnóstico definitivo

Como a leptospirose é uma zoonose, a confirmação de uma suspeita em cães, é muito importante também do ponto de vista de Saúde Pública e *One Health* (Jancloes et al. 2014; Ettinger et al. 2017). Existem vários métodos de diagnóstico disponíveis: os que detetam a bactéria; os que detetam anticorpos específicos contra a bactéria (Reagan and Sykes 2019).

O primeiro grupo inclui a visualização direta de *Leptospiras* por cultura, microscopia em fundo escuro ou deteção do ADN das espiroquetas por PCR. Esta abordagem é mais útil quando se está no início da doença, e antes da utilização de antibióticos, quando as bactérias estão em concentrações elevadas no sangue e na urina.

O segundo grupo reúne testes que detetam anticorpos contra a *Leptospira spp.* O mais utilizado é o teste de aglutinação microscópica (MAT) (Reagan and Sykes 2019).

A deteção de anticorpos pelo (MAT) ou por ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), e a deteção do ADN leptospiral por PCR, são os métodos de diagnóstico laboratorial mais frequentes (Ettinger et al. 2017).

2.4.3.1 Microscopia em fundo escuro

A visualização direta de leptospiros, no sangue e na urina de cães infectados, pode ser realizada através da microscopia em fundo escuro (Goldstein 2010; Reagan and Sykes 2019). Esta técnica, requer equipamento especial e técnicos qualificados e experientes, para mitigar o número de resultados falso-positivos (Sykes 2014; Reagan and Sykes 2019).

A microscopia em fundo escuro, é um método de diagnóstico com pouca especificidade e sensibilidade, e quando a amostra biológica é a urina, é necessário que seja recente (Ettinger et al. 2017). A baixa sensibilidade, resulta da curta duração da leptospiremia ou da prévia administração de antibióticos (Levett 2001; Reagan and Sykes 2019).

2.4.3.2 Biópsia dos tecidos

As leptospiros podem ser identificadas por microscopia, a partir de secções de tecidos, por exemplo de biópsias renais, através da coloração com Giemsa, da impregnação com prata, da imunohistoquímica, da imunofluorescência ou da hibridação “in situ” fluorescente (Greene et al. 2012; Sykes 2014; Reagan and Sykes 2019). O tratamento com antibióticos pode levar a resultados falso-negativos (Sykes 2014).

2.4.3.3 Cultura bacteriana

A cultura de leptospiros é muito morosa (cerca de 6 meses), e por isso, não é utilizada por rotina como método de diagnóstico, mas é útil na identificação de serovares (Ettinger et al. 2017; Reagan and Sykes 2019).

Recorre-se a meios de cultura seletivos, enriquecidos com vitamina B e ácidos gordos de cadeia longa, como o meio de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris, que é o mais utilizado. As culturas podem ser realizadas a partir de sangue, urina ou tecidos frescos. Está recomendado que nos primeiros 10 dias da doença se recorra a sangue (fase de leptospiremia), e posteriormente a urina (fase de leptospiruria), mas como normalmente desconhece-se o dia da infeção, deve enviar-se para o laboratório sangue e urina, de forma a aumentar a sensibilidade do teste (Reagan and Sykes 2019).

A cultura bacteriana tem baixa sensibilidade e o tratamento prévio com antibióticos pode conduzir a resultados falso-negativos (Sykes 2014), mas uma cultura positiva é prova de infeção (Reagan and Sykes 2019).

2.4.3.4 PCR

É um método de diagnóstico molecular, que deteta ADN de leptospiros patogénicas nos tecidos, no sangue e/ou na urina, antes que se desenvolva uma resposta imunológica

humoral à infecção, sendo por isso, mais precoce na detecção da doença do que os testes sorológicos (Branger et al. 2005; Sykes 2014).

A sensibilidade e a especificidade da PCR no diagnóstico de cães com leptospirose, não está ainda bem definida, e varia geograficamente (devido às diferenças nos padrões de excreção dos diferentes serovares) e entre laboratórios (Sykes 2014). As amostras devem ser recolhidas antes de se iniciar a antibioterapia, e deve enviar-se em simultâneo ao laboratório, amostras de urina e de sangue para aumentar a sensibilidade (Schuller et al. 2015).

Midence et al. (2012) fizeram um estudo, com o objetivo de perceber se as duas vacinas disponíveis no mercado para *Leptospira interrogans* serovar Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae, e *Leptospira kirscheneri* serovar Grippotyphosa, induziam um resultado positivo no PCR em tempo real. Usaram sangue de cães vacinados recentemente e de cães saudáveis. Verificaram que todas as amostras de sangue, testaram negativo no PCR após a vacinação.

A partir da PCR, não é possível saber qual o serovar ou serogrupo em causa (Sykes 2014). Um resultado positivo no sangue, é altamente sugestivo de leptospirose aguda, quando na presença de sinais clínicos compatíveis. Por outro lado, um resultado positivo na urina, indica excreção renal, o que pode ocorrer quer em cães na fase aguda da doença, quer nos portadores renais crónicos. Um resultado negativo tanto no sangue como na urina, não exclui a doença, porque a leptospiremia é transitória, ocorrendo apenas na fase inicial da doença e a excreção renal pode ser intermitente (Schuller et al. 2015).

2.4.3.5 Teste de aglutinação microscópica (MAT)

Para o diagnóstico laboratorial de leptospirose aguda, o MAT continua a ser considerado o *gold standard*. Avalia a capacidade do soro do cão suspeito de leptospirose, aglutinar com determinados serovares de *Leptospira spp. in vitro*, após várias diluições seriadas (Ettinger et al. 2017). Através da microscopia em fundo escuro, observa-se qual a maior diluição em que 50% das leptospiros estão aglutinadas, e regista-se o título de anticorpos (Reagan and Sykes 2019).

A melhor forma de confirmar uma infecção recente pelo MAT, é testar amostras na fase aguda e na fase de convalescença, recolhidas com 1-2 semanas de intervalo. Um aumento de 4x ou superior no título de anticorpos, em pelo menos 1 serovar, é necessário para o diagnóstico (Reagan and Sykes 2019). Mais tarde, pode repetir-se o teste, para verificar se ocorreu um decréscimo de 4x no título de anticorpos (Sykes 2014).

Não é incomum um resultado negativo no MAT durante a primeira semana de infecção, e a sensibilidade de um único teste feito na fase aguda é de apenas 50%. Contudo, aumenta para 100% quando se testa duas amostras (1 na fase aguda; 1 na fase de convalescença), com a especificidade a oscilar entre 70-100% (Fraune et al. 2013; Miller et al. citado por

Reagan and Sykes 2019). Os resultados dependem do controlo de qualidade do laboratório, registando-se uma variabilidade considerável entre diferentes laboratórios (Miller et al. 2011). O MAT apresenta limitações quanto há sensibilidade, especificidade e repetibilidade, especialmente se for interpretado um único título de anticorpos (Meri et al. 2005; Miller et al. 2011).

O painel de serovares que vão ser testados, deve ser escolhido com base na prevalência de anticorpos dos hospedeiros dessa área geográfica, porque se não se incluir o serogrupo que está a infetar o animal, pode ocorrer um falso-negativo (Schuller et al. 2015). Considerando as seroprevalências na Europa, no painel devem ser considerados pelo menos os seguintes serogrupos: Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes e Sejroe (Scanziani et al. 2002; André-Fontaine 2006; Geisen et al. 2007).

Podem ocorrer resultados falso-negativos em cães na fase aguda da doença, por ainda não terem produzido anticorpos específicos ou em casos de imunossupressão (Sykes 2014). Podem ocorrer resultados falso-positivos em cães que já foram expostos previamente ao agente na Natureza ou em cães vacinados, que podem apresentar títulos pós-vacinais $\geq 1:6400$, tanto a serovares vacinais, como a não vacinais, visto que pode ocorrer reatividade cruzada entre os diferentes serogrupos (Barr et al. 2005; Midence et al. 2012; Martin et al. 2014).

Por isso em cães vacinados, títulos elevados em serovares não incluídos na vacina, não indiciam necessariamente infeção natural (Midence et al. 2012; Martin et al. 2014; Sykes 2014). Num estudo de Martin et al. (2014) a maioria dos cães vacinados, apresentaram títulos de anticorpos negativos 15 semanas após a vacinação, mas os títulos vacinais podem persistir durante 12 meses.

O tratamento com antibióticos pode atenuar a resposta sorológica, mas geralmente a seroconversão costuma ocorrer, e consegue-se por isso alcançar normalmente um aumento de 4x no título de anticorpos (Reagan and Sykes 2019).

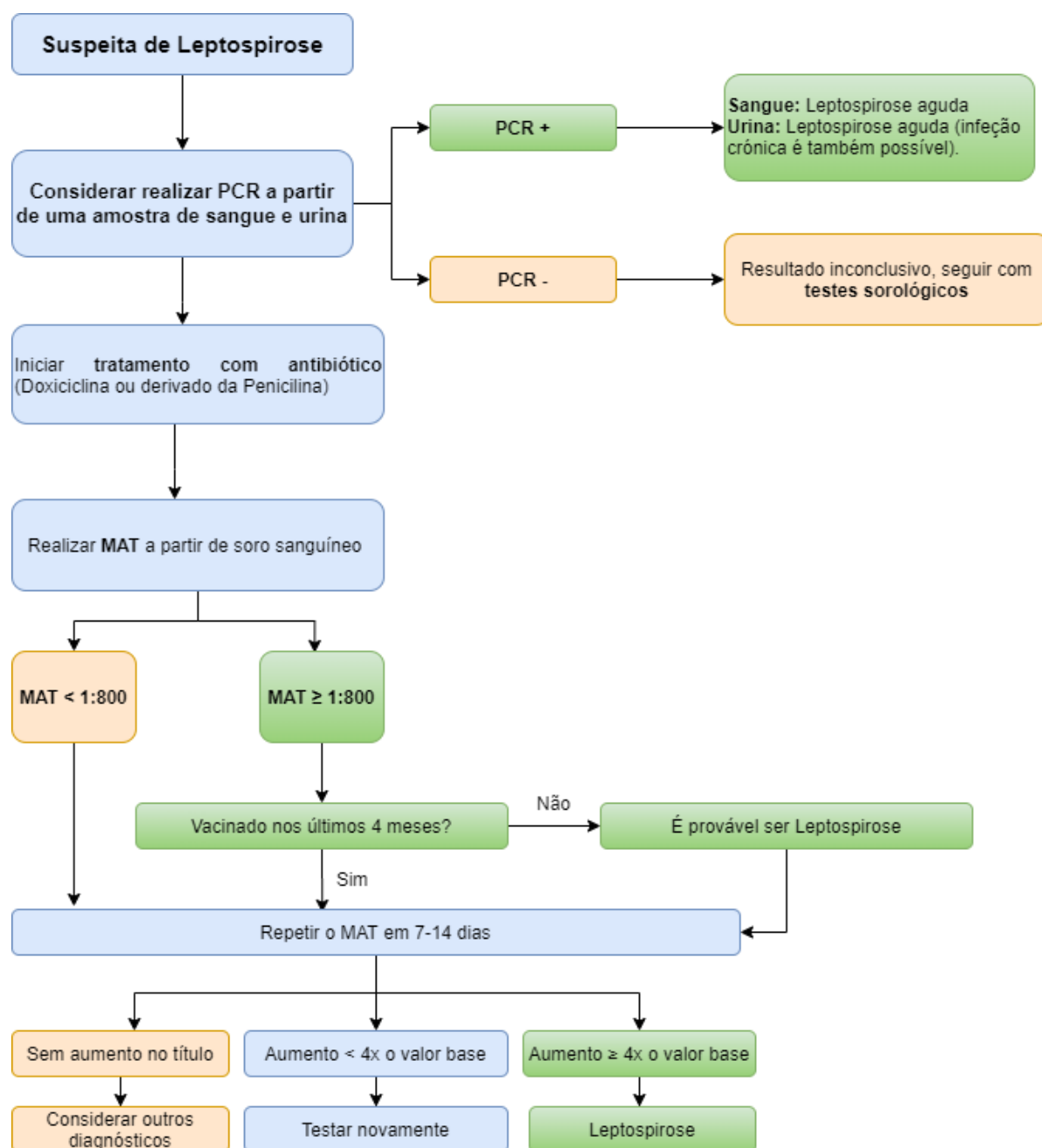


Figura 1- Fluxograma do diagnóstico laboratorial perante uma suspeita de leptospirese (Ettinger et al. 2017).

2.4.3.6 ELISA- Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

A detecção de imunoglobulinas M (IgM) e/ou de imunoglobulinas G (IgG) contra a *Leptospira spp.* pela ELISA, está a tornar-se o método de diagnóstico mais utilizado, por ser rápido e ter a vantagem em relação ao MAT, de não exigir culturas vivas de *Leptospira* (Schuller et al. 2015; Reagan and Sykes 2019).

Ao utilizar-se a ELISA para detetar IgM em cães infetados, verifica-se que ocorre um aumento 1 semana após a infeção inicial, e que o título máximo atinge um pico ao fim de 2

semanas, registrando-se a partir daí um decréscimo. A detecção de IgM por ELISA, é mais sensível numa fase inicial da infecção, do que no MAT (Greene et al. 2012).

Nos cães, o aumento do título de IgG pelo ELISA, ocorre 2-3 semanas após a infecção, com um título máximo em aproximadamente um mês. Ao contrário do que se verifica no MAT e nos títulos de IgM, os títulos de IgG aumentam bastante após a vacinação e persistem por muitos meses (Greene et al. 2012).

Ao determinar IgG e IgM, a ELISA é melhor do que o MAT na distinção entre uma infecção natural e uma resposta imunitária induzida por vacinação. Segundo Greene et al. (2012), cães revacinados contra a leptospirose mais do que uma vez, demonstraram um título de IgG elevado, acompanhado por um título de IgM baixo ou negativo, mesmo nas primeiras semanas após a vacinação.

De forma a aumentar a especificidade, a ELISA deteta anticorpos contra toda a célula bacteriana e contra certas proteínas antigénicas recombinantes da superfície bacteriana (Reagan and Sykes 2019). A proteína LipL32 é visada por ser expressa apenas por leptospiros patogénicas e existir nos diferentes serogrupos (Haake et al. 2000; Dey et al. 2004).

Como a ELISA é feita rapidamente e apresenta uma elevada sensibilidade na fase inicial da doença, a sua realização pode ser útil, contudo está aconselhado solicitar este teste enquanto se aguardam os resultados do MAT ou do PCR (Reagan and Sykes 2019).

2.4.3.7 Testes rápidos de imunocromatografia e ELISA

Recentemente foram disponibilizados no mercado, testes rápidos de imunocromatografia e de ELISA, que detetam anticorpos específicos contra a *Leptospira spp.* em cães (Curtis et al. 2015; Kodjo et al. 2016). Foram desenvolvidos com o objetivo de serem realizados durante a consulta, de forma a se obter um diagnóstico imediato (Reagan and Sykes 2019).

O SNAP Lepto é um teste rápido de ELISA, que deteta anticorpos contra a proteína LipL32. Curtis et al. (2015) compararam a especificidade e a sensibilidade do SNAP Lepto com o MAT (*gold standard*), e verificaram concordância entre os dois testes em 83,2% dos casos, para títulos do MAT $\geq 1:800$. Quando usaram o SNAP Lepto para detetar anticorpos, em cães não suspeitos de leptospirose, a especificidade foi de 96%, em comparação com o MAT.

Em cães vacinados contra a leptospirose, não está recomendado o uso do SNAP Lepto, pois tal como no MAT, podem ser detetados anticorpos vacinais que darão resultados falso-positivos. Foi descrito que 24,0% dos cães testados com o SNAP Lepto, um ano após a vacinação contra a leptospirose, deram resultados falso-positivos (Curtis et al. 2015). Em 22 cães corretamente diagnosticados com leptospirose, o SNAP Lepto foi positivo em 68,0% dos casos (15/22), e deu resultados falso-positivos em 15,0% dos cães (Winzelberg et al. 2015).

O Witness Lepto é um teste rápido de imunocromatografia que deteta IgM, e que permite obter um resultado durante a consulta em 10 minutos (Kodjo et al. 2016; Lizer et al. 2017). O teste usa extratos de células bacterianas de *Leptospira Kirscheneri* serovar Grippotyphosa e de *Leptospira interrogans* serovar Bratislava (antigénio), para detetar IgM produzidas em resposta à infeção (Kodjo et al. 2016). Em França, num grupo de cães suspeitos de leptospirose, o Witness Lepto revelou uma sensibilidade de 98,0% e uma especificidade de 93,5%, comparativamente com o diagnóstico através do MAT. O Witness Lepto tem as vantagens de rapidamente identificar um caso agudo de leptospirose e de apresentar elevada sensibilidade e especificidade, sem interferência por vacinações prévias (Kodjo et al. 2016). Contudo, noutro estudo realizado na Alemanha, verificou-se que 12 semanas após a vacinação, 24,0% dos cães (vacinados e não infetados com leptospirose) testaram positivo no Witness Lepto, por reação cruzada com anticorpos produzidos em resposta à vacina. A sensibilidade do Witness Lepto foi de 75,0%, enquanto que um único teste de MAT realizado na fase aguda, apresentou uma sensibilidade de apenas 24,0%, em cães diagnosticados com leptospirose. É por isso recomendado, que a interpretação de um resultado positivo, seja feita tendo em conta os sinais clínicos e as vacinações realizada previamente (Lizer et al. 2017). Em Itália, foi realizado um estudo em 89 cães com suspeita clínica de leptospirose, onde compararam a sensibilidade e a especificidade entre o Witness Lepto, o SNAP Lepto e um único teste de MAT na fase aguda, relativamente ao diagnóstico final com a *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) e/ou o MAT na fase aguda e em alguns cães, também na fase de convalescença (Troia et al. 2018). Os resultados encontram-se registados na tabela 3.

Tabela 3- Sensibilidade e especificidade dos testes Witness Lepto, SNAP Lepto e MAT (fase aguda) relativamente ao diagnóstico final com qPCR e/ou MAT. (Troia et al. 2018).

Teste de diagnóstico	Sensibilidade	Especificidade
Witness Lepto	78,9%	97,6%
SNAP Lepto	86,5%	75,0%
MAT (fase aguda)	70,3%	100%

São necessários mais estudos, para avaliar de modo robusto e consistente a eficácia destes testes rápidos, em diferentes localizações geográficas, porque a sensibilidade pode ser afetada pelos serovares em circulação (Reagan and Sykes 2019).

2.4.4 Achados patológicos

As alterações macroscópicas, mais frequentemente encontradas nas necrópsias de cães infectados com leptospirose, são a icterícia, as petéquias, as equimoses e, por vezes, trombos de fibrina (Sykes 2014).

Klopfleisch et al. (2010) fizeram um estudo baseado nas necrópsias de 15 cães, diagnosticados com leptospirose e suspeitos de Síndrome Pulmonar Hemorrágica Leptospiral. Macroscopicamente, encontraram as seguintes alterações: os pulmões encontravam-se pesados, húmidos, de cor vermelha escura, com bastante sangue não coagulado ao corte; as vias aéreas principais estavam repletas por um líquido espumoso vermelho escuro; os linfonodos pulmonares e mediastínicos, encontravam-se também vermelhos escuros, com hemorragia aguda e reabsorção de sangue. Cinco cães apresentavam petéquias na mucosa da bexiga, quatro icterícia ligeira a moderada e melena, e três hemorragia aguda e ligeira na vesícula biliar.

Podem ainda estar presentes na necrópsia, ascite, derrame pleural e/ou do pericárdio. Os rins de cães que morreram na fase aguda da doença, podem estar ligeiramente aumentados, pálidos, com petéquias e por vezes, podem apresentar enfartes. Os cães com doença renal crónica, secundária à infeção, podem apresentar rins pequenos e irregulares (Sykes 2014).

O fígado pode estar aumentado de tamanho, friável e com uma descoloração castanha-amarelada. Em animais urémicos, é frequente encontrar-se gastrite hemorrágica e ulcerativa (Greene et al. 2012).

Histologicamente, as alterações mais comuns em cães com a Síndrome Pulmonar Hemorrágica Leptospiral são os alvéolos pulmonares preenchidos com eritrócitos; necrose ligeira dos pneumócitos; presença de pequenas quantidades de fibrina intra-alveolar e de membranas hialinas. A infeção dos rins por leptospirosas, conduz a uma nefrite intersticial com mistura de infiltrados inflamatórios, mas pode também observar-se necrose tubular aguda, como resultado da isquémia renal e da vasculite (Klopfleisch et al. 2010; Sykes 2014).

As alterações histológicas no fígado, geralmente são ligeiras, e incluem a necrose hepática, a hepatite periportal neutrofílica e a colestase. Está também descrita a ocorrência de miocardite neutrofílica multifocal e necrosante, e a necrose do músculo esquelético (Sykes 2014).

2.5 Tratamento

2.5.1 Antibioterapia

Na fase inicial do tratamento é recomendado o uso de penicilina ou doxiciclina, que devem ser iniciadas o mais cedo possível, mesmo antes de se obter a confirmação laboratorial do diagnóstico (Sykes 2014). Quando a antibioterapia é iniciada quatro a sete dias após o início da doença, a recuperação é mais difícil de ocorrer (Sykes et al. 2011).

Truccolo et al. (2002) usaram hamsters como modelo biológico, e testaram a suscetibilidade da *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae à ampicilina e à doxiciclina. Através de um PCR quantitativo, monitorizaram a densidade das leptospiros no sangue e em órgãos-alvo, como o fígado, rins, pulmões, coração e baço, e constataram que a ampicilina numa dose elevada (100 mg/kg), eliminou as leptospiros, com exceção dos rins e do coração, pois ao 6º dia de antibioterapia ainda permaneciam nestes dois órgãos. Com a doxiciclina (10mg/kg), a eliminação das leptospiros ocorreu em 2 dois dias, em todos os órgãos, à exceção do fígado onde foram necessários 3 dias de antibioterapia.

A escolha inicial do antibiótico, depende se o tratamento oral com doxiciclina é ou não tolerado, porque os cães com leptospirose, apresentam frequentemente sinais gastrointestinais como vômito. Nestes casos, recomenda-se iniciar o tratamento com um derivado da penicilina (penicilina G, ampicilina ou amoxicilina) por via intravenosa, para eliminar a bacteriemia até a doxiciclina poder ser usada (Schuller et al. 2015). É por isso recomendado que cães com leptospirose, sejam tratados com 5mg/kg de doxiciclina a cada 12 horas ou 10 mg/kg a cada 24 horas, durante 14 dias. É fundamental que sejam cumpridos os 14 dias de antibioterapia, para eliminar a excreção renal de leptospiros (Schuller et al. 2015). Os cães que inicialmente apresentarem sinais gastrointestinais, devem ser tratados com um derivado da penicilina por via intravenosa (20-30 mg/kg de ampicilina ou amoxicilina a cada 6-8 horas). Nos cães com diminuição da função renal, deve-se ajustar a dose (Schuller et al. 2015). A doxiciclina pode causar esofagite e úlceras esofágicas, por isso deve ser administrada juntamente com alimento ou deve oferecer-se água ao animal após a toma do comprimido, de forma a reduzir este risco (Ramsey 2014).

2.5.2 Tratamento da insuficiência renal aguda

A correção dos fluidos, dos eletrólitos e das alterações ácido-base, através da fluidoterapia com cristaloides, é fundamental para reverter os casos de insuficiência renal aguda, juntamente com o tratamento da hipertensão sistêmica, das alterações gastrointestinais, do manejo da dor e do suporte nutricional (Schuller et al. 2015; Knöpfler et al. 2017). Nos cães com oligúria ou anúria, deve vigiar-se uma possível sobrecarga de fluídos,

visto que vai exacerbar a disfunção de vários órgãos, principalmente ao nível dos pulmões e do trato gastrointestinal (Schuller et al. 2015).

A oligúria (produção de urina <2 ml/kg/hora) e a anúria, são tratadas inicialmente com a fluidoterapia. Porém, se após a reidratação a condição persistir, é recomendado o uso de diuréticos osmóticos, como a glucose a 10-20% (5ml/kg) ou o manitol a 20% (0,5g/kg), que devem ser administrados durante 30-60 minutos por via intravenosa (Greene et al. 2012). Se o tratamento com estes diuréticos falhar, a dopamina (2,5 a 5 μ g/kg/min) pode ser utilizada, isoladamente ou em conjunto com a furosemida (2-4 mg/kg), para aumentar a taxa de produção urinária (Greene et al. 2012).

Os cães em anúria devem receber metade da taxa de manutenção (1ml/kg/h), enquanto os cães em poliúria podem necessitar de mais de 10x a taxa de manutenção (>20 ml/kg/h). Deve proceder-se à algaliação em sistema fechado, de forma a quantificar a produção de urina (Sykes 2014; Schuller et al. 2015).

A hemodiálise está recomendada nas seguintes situações: em cães que não respondem à fluidoterapia com uma produção de urina inadequada; nos cães que desenvolvam uma sobrecarga de fluidos; nos cães que apresentam hipercalemia e ureia >80 mg/dL; nos cães com uremia que não respondem ao manejo médico de suporte. Normalmente, após o início da hemodiálise, a recuperação da função renal ocorre em 2-4 semanas, e por vezes, apenas são necessários 1-3 tratamentos para a poliúria e a função renal comecem a ocorrer (Sykes et al. 2011).

A hemodiálise ou a administração de quelantes de fósforo, estão recomendadas em cães que apresentem hiperfosfatemia. O manejo da dor com opióides, incluindo a buprenorfina ou o fentanil, também está recomendado (Schuller et al. 2015). A ocorrência de vômito é muito comum, devido à uremia e gastrite urémica, e por isso, nestes casos, deve-se administrar antieméticos como o maropitant, o ondansetron ou a metoclopramida e protetores gástricos inibidores da bomba de prótons, como o omeprazol (Greene et al. 2012; Knöpfner et al. 2017). Em associação com o protetor gástrico referido, pode ser utilizado o sucralfato, com um intervalo de pelo menos 2 horas antes da administração dos restantes fármacos, de forma a não diminuir a absorção dos mesmos (Juvet et al. 2011; Ramsey 2014). O sucralfato está indicado no tratamento de úlceras esofágicas, gástricas e duodenais (Ramsey 2014).

2.5.3 Tratamento das hepatopatias

Como as alterações hepáticas se manifestam com pouca frequência como uma insuficiência hepática grave, com encefalopatia hepática, convulsões por hipoglicémia ou ascite, o tratamento é essencialmente de suporte. O potencial benefício do uso de antioxidantes e coleréticos, não foi avaliado em cães com leptospirose (Schuller et al. 2015).

Em cães com alterações hepáticas, está descrito o uso de S-Adenosilmetionina (SAME) porque aumenta os níveis da glutatona hepática, um potente antioxidante que protege os hepatócitos das toxinas, na dose de 20 mg/kg, por via oral, a cada 24 horas (Juvet et al. 2011; Ramsey 2014).

2.5.4 Tratamento da Síndrome Pulmonar Hemorrágica Leptospiral

Devem ser realizadas radiografias torácicas, mesmo na ausência de sinais clínicos respiratórios, para detetar alterações e implementar precocemente medidas preventivas, como mitigar o stress, a manipulação excessiva, a sobrecarga de fluidos/hipervolemia e controlar a hipertensão sistémica (Ettinger et al. 2017).

Dependendo da gravidade da hemorragia pulmonar, pode ser necessária oxigenioterapia, e nos casos mais graves, ventilação mecânica (Schuller et al. 2015).

No Homem, tem sido testada com resultados promissores a eficácia de tratamentos imunomoduladores, baseada na hipótese de que a Síndrome Pulmonar Hemorrágica Leptospiral, é causada por mecanismos imunomediados (Ettinger et al. 2017).

Em pacientes humanos com leptospirose e graves alterações pulmonares associadas, foi ensaiado um tratamento precoce com uma dose de 500 mg de metilprednisolona, por via intravenosa, durante 3 dias, seguido do tratamento oral com uma dose de 8 mg, durante 5 dias, e verificou-se uma redução de 11,1% na taxa de mortalidade (Kularatne et al. 2011). Em outros estudos realizados em humanos, a ciclofosfamida e a plasmaferese, também proporcionaram bons resultados (Chen et al. 2007; Trivedi et al. 2009).

Em cães, foi sugerida a utilização de metilprednisolona (5-10 mg/kg/dia), por via intravenosa durante 3 dias, e de seguida por via oral, com uma dose de 1 mg/kg/dia durante 7 dias. Este tratamento só está recomendado em situações de emergência, com alterações pulmonares graves, porque há o risco de ocorrerem complicações, associadas à utilização de uma dose tão alta de metilprednisolona (Greene et al. 2012). A eficácia do tratamento com imunossuppressores, em cães com alterações pulmonares graves, precisa de ser melhor avaliada (Greene et al. 2012). Em cães com dispneia grave, está descrita a utilização da teofilina como broncodilatador (Kohn et al. 2010).

2.5.5 Tratamento das alterações hemorrágicas

Em cães com leptospirose, as desordens da hemóstase, variam em termos de severidade e são multifatoriais. A trombocitopenia é um achado comum em cães com leptospirose, mas raramente necessita de tratamento específico (Schuller et al. 2015).

Nos casos de coagulação intravascular disseminada devem-se fazer transfusões de plasma, fresco ou congelado, de forma a repor os fatores de coagulação consumidos (Bruchim

et al. 2008). O uso de heparina não é recomendado nos casos de CID, exceto se o cão estiver num estado muito elevado de hipercoagulabilidade (Schuller et al. 2015).

2.6 Resposta ao tratamento e acompanhamento clínico após a recuperação

A recuperação da função renal, pode exigir vários meses após a estabilização inicial, e desde que os cães se mantenham adequadamente hidratados e com uma alimentação normal, não requer hospitalização. Alguns cães que aparentemente recuperam e normalizam as concentrações de creatinina, podem sofrer danos residuais no parênquima renal, e virem a desenvolver mais tarde doença renal crónica (Schuller et al. 2015).

Segundo Kis et al. (2012), citado por Schuller et al. (2015) aproximadamente 50% dos cães com leptospirose que sobrevivem à fase aguda da doença, desenvolvem alterações da função renal, mais de um ano após a hospitalização. É por isso recomendado que, 1 semana após a alta, e a cada 1-3 semanas até à estabilização clínica, os cães sejam reavaliados, incluído a medição da pressão arterial, análises sanguíneas (ureia, creatinina, fósforo, eletrólitos e albumina) e urianálise. A monitorização deve ser continuada a intervalos de um, três e seis meses (Schuller et al. 2015).

O sucesso do tratamento está associado à normalização da contagem das plaquetas, da concentração sérica de ureia e creatinina, e da atividade das enzimas hepáticas em 10 a 14 dias, embora a regeneração do tecido renal, possa continuar por mais 4 semanas após o tratamento da infeção (Sykes et al. 2011). A icterícia pode demorar mais tempo a ser resolvida, e a capacidade de concentrar a urina, poderá estar alterada durante pelo menos 4 semanas (Sykes 2014).

2.7 Prognóstico

O prognóstico depende da gravidade dos sinais clínicos e das complicações secundárias. A insuficiente função renal, hepática e pulmonar conduz a elevadas taxas de mortalidade, quer em humanos quer em cães (Gilad and Borer 2000; Dolhnikoff et al. 2007; Kohn et al. 2010; Greene et al. 2012).

Nos casos de leptospirose aguda, quando o tratamento é rapidamente instituído, com antibioterapia e fluidoterapia adequadas, e na ausência de complicações respiratórias graves, o prognóstico é bom (Sykes et al. 2011). A taxa de mortalidade parece variar entre os 11% e os 48%, sendo que as taxas de mortalidade mais baixas, registam-se em hospitais veterinários onde é possível realizar hemodiálise (Adin and Cowgill 2000; Goldstein et al. 2006; Geisen et al. 2007; Mastroilli et al. 2007; Knöpfler et al. 2017).

Nos cães com alterações respiratórias graves, o prognóstico é bastante reservado (Kohn et al. 2010). Na Alemanha foi reportada uma taxa de mortalidade de 36%, associada a uma elevada frequência de complicações respiratórias (Klopfeisch et al. 2010). A Síndrome de Hemorragia Pulmonar Leptospiral, induziu uma taxa de mortalidade superior a 70% em cães infetados, segundo um estudo de Schuller et al. (2015).

Os cães com azotémia, aumento da concentração sérica de troponina-I, aumento do rácio proteína C-reativa/haptoglobina, aumento do rácio proteína/creatinina urinária e com uma diminuição da concentração sérica de albumina, têm um maior risco de morte do que cães sem estas alterações (Rentko et al. 1992; Birnbaum et al. 1998; Adin and Cowgill 2000; Mastroilli et al. 2007).

Knöpfler et al. (2017) realizaram um estudo com 99 cães diagnosticados com leptospirose, e verificaram que não havia diferenças significativas no que diz respeito à idade, ao peso e ao género, entre os cães que sobreviveram e os que morreram com leptospirose.

2.8 Prevenção

As principais medidas de profilaxia sanitária, consistem em restringir o contacto dos cães, com potenciais hospedeiros reservatórios e com fontes de água ambientais. O contacto com animais selvagens e espécies pecuárias, deve ser reduzido recorrendo a cercas, e o controlo dos roedores também contribui para a redução do risco de infeção (Sykes 2014). Quando não for possível aplicar estas medidas preventivas, e sempre que o risco for elevado, a vacinação está recomendada (Sykes 2014).

2.8.1 Imunidade e vacinação

Não estão descritos casos de reinfeção em cães com leptospirose, após serem tratados com sucesso. Contudo, como podem voltar a ser expostos a doses infetantes no mesmo meio ambiente, e considerando que a duração da imunidade após infeção natural é desconhecida, a vacinação está recomendada nestes casos (Sykes 2014; Schuller et al. 2015). Além disso, os cães que recuperaram de uma infeção por *Lepstospira* spp., podem ser expostos a serovares de outros serogrupos, por isso a sua vacinação também é recomendada (Schuller et al. 2015).

A imunidade após a vacinação com vacinas inativadas, é específica do serogrupo e possivelmente também do serovar, apesar de um estudo realizado por Sonrier et al. (2000) ter demonstrado uma imunidade parcial a serogrupos heterólogos.

A vacinação está recomendada para cães com estilos de vida que os coloquem em risco de exposição, como os cães que possam contactar com animais selvagens e/ou espécies pecuárias; cães que nadam ou bebem de fontes de água ambientais; cães que vivem no exterior e que possam contactar direta ou indiretamente com roedores (Sykes 2014).

As vacinas bivalentes, que contêm apenas os serovares *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola*, foram as primeiras vacinas a ser disponibilizadas em 1960 na Europa e nos E.U.A. para a prevenção da leptospirose canina. Na Europa, surgiu posteriormente uma vacina trivalente, que para além dos serovares referidos anteriormente, abrange também o serovar *Grippotyphosa*, e recentemente uma vacina quadrivalente, com os serovares *Copenhageni* (serogrupo *Icterohaemorrhagiae*), *Portland-vere* (serogrupo *Canicola*), *Bratislava* (serogrupo *Australis*) e *Dadas* (serogrupo *Grippotyphosa*).

Na vacinação contra a leptospirose, a 1ª dose da primovacinação deve ser administrada a partir das 8 semanas de idade, com uma 2ª dose 2-4 semanas depois, e depois revacinações anuais. Nos cães adultos que nunca tenham sido vacinados contra a leptospirose, também é recomendado administrar duas doses, com 2-4 semanas de intervalo, e a revacinação deve ser feita anualmente (Day et al. 2016). Nos cães que não foram revacinados por mais de 18 meses, deve-se reiniciar o programa vacinal, com duas doses administradas num intervalo de 3-4 semanas (Schuller et al. 2015).

Estas vacinas veiculam bactérias inativadas, que previnem a doença e reduzem a probabilidade de ocorrência de excreção urinária, após o contato com os serovares incluídos na vacina (Minke et al. 2009; Sykes 2014). A duração da imunidade, após uma vacinação correta, é de pelo menos 12 meses (Klaasen et al. 2003; Day et al. 2016).

A vacinação contra a leptospirose tem sido associada a reações de hipersensibilidade do tipo I, com o surgimento de reações anafiláticas, especialmente em cães de raças pequenas. Porém, já há evidência científica de que a frequência destas reações está a diminuir, e que é similar à induzida por vacinas para outros agentes infecciosos (Sykes et al. 2011; Sykes 2014). Num estudo que avaliou as reações adversas agudas após a vacinação de cães, verificou-se que as vacinas que continham o antígeno leptospiral, não causaram mais reações do que as outras vacinas utilizadas (Moore et al. 2005).

Em Berlim foi realizado recentemente um estudo, que reuniu 99 cães diagnosticados com leptospirose, dos quais 80,0% foram vacinados com a vacina bivalente para a leptospirose, nos 12 meses anteriores (Knöpfler et al. 2017). Através do MAT, verificaram que os principais serogrupos infetantes foram o *Grippotyphosa* (65,0%), o *Australis* (61,0%) e o *Pomona* (60,0%). Apenas 28,0% e 4,0% dos cães foram infetados respetivamente, com o serogrupo *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* (Knöpfler et al. 2017). Na Europa, considerando as ocorrências de casos de leptospirose em cães vacinados com vacinas bivalentes, o uso de vacinas quadrivalentes está recomendado, na tentativa de aumentar o espetro de proteção (Schuller et al. 2015).

Não está claro, se a introdução da vacina bivalente nos anos 60 na Europa e nos Estados Unidos da América, foi a principal causa na alteração da prevalência dos serogrupos, com uma diminuição reportada nos serogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* abrangidos

pela vacina, e um aumento das infeções causadas pelos serogrupos Grippothyphosa, Pomona e Australis (Adler and Klaasen 2015). Para além da vacina prevenir a infeção e a manifestação clínica da doença, a prevenção da colonização renal e da excreção crónica de leptospiros na urina, é um fator muito importante a ponderar na avaliação das vacinas disponíveis (Rojas et al. 2010; Grosenbaugh and Pardo 2018).

Andre et al. (2003) realizaram um estudo comparativo da eficácia de três vacinas inativadas comerciais, contra a infeção e a excreção renal de leptospiros. Os cães foram vacinados com duas doses, às 9 e às 12 semanas de idade, e 34 dias após a administração da 2ª dose foram infetados experimentalmente com o serovar Canicola. As vacinas utilizadas, conferiam proteção contra os serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae. Verificaram que, das três vacinas investigadas, apenas numa todos os cães infetados experimentalmente apresentaram culturas de sangue e de urina negativas, enquanto que nos cães vacinados com as outras duas vacinas, se obtiveram culturas de sangue e de urina positivas, apesar de numa proporção muito menor, comparativamente com o grupo controlo.

Os cães vacinados contra a leptospirose, podem continuar a excretar leptospiros na urina, representando um risco para a infeção de humanos, visto que o nível de proteção conferido pela vacinação, varia entre as várias vacinas disponíveis no mercado (Andre et al. 2003; Klaasen et al. 2003; Adler and Klaasen 2015).

Noutro estudo, observou-se que a maioria dos cães vacinados com a vacina quadrivalente, desenvolveram uma proteção contra a leptospirose e a leptospiúria face à *Leptospira* serovar Grippotyphosa, de pelo menos 15 meses (Grosenbaugh and Pardo 2018).

Um problema nas vacinas contra a leptospirose, é que o seu espetro de eficácia não pode ser resolvido, através do aumento da quantidade de antígeno protetor, porque a proteção é direcionada apenas para os serovares incluídos na vacina, ou para os serovares estreitamente relacionados (Levett 2001; Adler and Klaasen 2015).

O espetro de eficácia de uma vacina, requer o conhecimento da epidemiologia local/regional, que pode ser obtido através da identificação dos serovares mais prevalentes localmente/regionalmente (Adler and Klaasen 2015). À medida que surgem novos serovares, estes devem ser adicionados às vacinas existentes, de forma a induzirem proteções mais abrangentes (Grosenbaugh and Pardo 2018).

2.9 Saúde Pública

No Homem, o período de incubação da leptospirose são 2 a 20 dias, com uma duração média de 10 dias. Em 90% das infeções, os sintomas são semelhantes aos de uma gripe ligeira, sendo uma doença difícil de diferenciar na fase inicial (Sykes 2014). As manifestações mais graves de leptospirose em humanos, são a insuficiência renal e hepática (Weil's

Disease), ou a Síndrome Pulmonar Hemorrágica Leptospiral. Em grávidas pode ocorrer aborto (Sykes et al. 2011; Sykes 2014).

A transmissão da doença, a partir de animais infetados aos humanos, ocorre através da urina. Todavia, os cães que são tratados com a antibioterapia adequada, apresentam um baixo risco de transmitir a doença, e a excreção na urina só começa 7-10 dias após a infeção, por isso, os primeiros dias não constituem uma fonte de infeção relevante (Sykes et al. 2011).

Em países em vias de desenvolvimento, os cães são considerados hospedeiros reservatórios para a *Leptospira interrogans* serovar Canicola, e representam um risco para os humanos expostos (Brod et al. 2005). Foi realizado um estudo na Argélia, onde foram feitos dois tipos de PCR, convencional e em tempo real, em amostras de urina de 104 cães saudáveis e 107 gatos saudáveis, de forma a investigar se estavam ou não a excretar leptospiros na urina. Verificou-se que nos gatos não houve nenhuma amostra positiva, mas nos cães 4,8% das amostras eram positivas (Zaidi et al. 2018).

Contudo, existem evidências de uma elevada seroprevalência de leptospirose em gatos, o que sugere que a exposição dos gatos às leptospiros e o seu papel na transmissão da leptospirose aos humanos, pode ter uma maior importância clínica nesta espécie, do que tem sido previamente descrito (Arbour et al. 2012; Hartmann et al. 2013). Os gatos são predadores dos pequenos roedores, e por isso a transmissão pela via presa-predador é provável que ocorra (Loss and Marra 2017; Parsons et al. 2018).

Silva et al. (2020) realizaram um estudo na área metropolitana de Lisboa, com o objetivo de determinar a seroprevalência de IgG anti-leptospira em gatos. Verificaram que 59,3% dos gatos eram seropositivos. Considerando que as leptospiros se podem alojar nos túbulos renais de várias espécies, nomeadamente dos gatos (Parsons et al. 2018), este estudo reforça o risco de os gatos poderem ser uma possível via de infeção para os humanos.

Geralmente assume-se que a leptospiúria cessa em poucos dias, após o início do tratamento com doxiciclina. Contudo, Juvet et al. (2011) reportaram um caso de um cão diagnosticado com leptospirose aguda, onde se observaram leptospiros na urina, através da microscopia em fundo escuro, 5 dias após o tratamento com penicilina e 8 dias após o tratamento com doxiciclina (10 mg/kg, 12-12 horas). Por isso, a cinética da excreção urinária de leptospiros em cães que estão em tratamento, merece mais estudos (Schuller et al. 2015).

Foi demonstrado noutro estudo, que a seropositividade à *Leptospira* spp foi rara em detentores expostos a cães com leptospirose aguda e nos trabalhadores de um hospital veterinário de referência, com uma casuística elevada de cães internados com leptospirose (Barmettler et al. 2011). Contudo, o risco da exposição de humanos a cães e a gatos infetados, carece de investigação (Schuller et al. 2015).

Os detentores de cães diagnosticados com leptospirose, devem ser informados do potencial zoonótico da doença e aconselhados a contactarem o seu médico de família

(principalmente quando crianças, grávidas e imunocomprometidos forem expostos), assim como a lavarem as mãos depois de interagirem com o seu cão. Enquanto os seus cães estiverem a fazer antibioterapia, devem utilizar luvas ao limpar a urina, caso seja necessário, e utilizar lixívia a 10% como desinfetante, numa diluição a 1:1 (Schuller et al. 2015; Ettinger et al. 2017).

Todos os cães com insuficiência renal aguda, devem ser manuseados como sendo suspeitos de leptospirose, com todos os equipamentos de proteção individual (EPI) e cuidados necessários, até se estabelecer um diagnóstico definitivo, de forma a diminuir o risco de transmissão da doença aos trabalhadores dos hospitais e clínicas veterinárias (Sykes et al. 2011).

Nos hospitais e clínicas veterinárias devem ser aplicadas as seguintes medidas, sempre que se suspeite ou seja confirmado um caso de leptospirose: utilizar desinfetantes hospitalares (compostos de amónia quaternária, soluções de peróxido de hidrogénio aceleradas, iodados e soluções de lixívia), imediata e adequadamente, nas superfícies conspurcadas com urina; sempre que possível, limitar a circulação dos cães na clínica/hospital; algaliar os cães em sistema fechado; utilizar sempre EPI (touca, óculos de proteção, máscara, fatos impermeáveis descartáveis e protetores de sapatos); lavar bem as mãos após retirar as luvas; inativar a urina com desinfetantes (por exemplo, com uma solução de lixívia a 10% diluída a 1:1); iniciar o tratamento com doxiciclina o mais depressa possível para eliminar a excreção urinária; informar todo o pessoal que teve contacto direto ou indireto com o cão infetado dos riscos; eliminar de forma correta todos os fluidos corporais e materiais contaminados (Schuller et al. 2015).

As jaulas devem estar devidamente identificadas, em como é um caso suspeito ou confirmado de leptospirose, devem ser limpas e desinfetadas diariamente, e o contato destes cães com grávidas ou imunocomprometidos deve ser negado (Sykes et al. 2011).

Pode ocorrer a infeção concomitante de cães que residem na mesma casa, provavelmente por terem o mesmo risco de exposição ambiental. Está por isso recomendado, a cães que vivem com outros cães diagnosticados com leptospirose, a administração de 5 mg/kg de doxiciclina a cada 12 horas, ou de 10 mg/kg a cada 24 horas, durante 2 semanas. O tratamento de gatos que vivem na mesma casa não está aconselhado (Schuller et al. 2015).

Em Portugal, a leptospirose é uma doença de declaração obrigatória em Medicina Humana, tendo sido notificados 257 casos à Direção-Geral da Saúde entre 2013-2016 (Gaspar et al. 2017), contudo em Medicina Veterinária, a leptospirose não faz parte da lista de doenças de declaração obrigatória, publicada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV 2015).

Em Portugal, foi realizado um estudo epidemiológico retrospectivo sobre a leptospirose em humanos, no período de 1986 a 2003, e verificou-se que, o número de casos notificados

em Portugal Continental, é relativamente baixo, quando comparado com a Região Autónoma dos Açores, sobretudo nas ilhas Terceira e de São Miguel (Vieira et al. 2006). Nesse mesmo estudo, os fatores de risco identificados, foram o contacto com água não tratada, com animais domésticos (vacas, porcos e cães) e com roedores. A seroprevalência foi maior nas áreas rurais e no inverno (entre Dezembro e Janeiro), com uma predominância dos serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona e Ballum (Vieira et al. 2006).

3. Estudo

3.1 Objetivos

Os principais objetivos deste estudo são: (1) caracterizar as infeções por leptospirose canina, em cães internados na UICB do HE da FMV-ULisboa, no período de 2013 a 2019; (2) identificar fatores de risco e possíveis indicadores de prognóstico.

3.2 Material e métodos

3.2.1 População em estudo

A população de trabalho foi constituída pelos históricos médicos de 165 cães, com sinais clínicos compatíveis com leptospirose, hospitalizados na UICB, no período de dezembro de 2013 a dezembro de 2019.

3.2.2 Fontes de dados e análise estatística

Consultaram-se as fichas individuais dos cães referidos em 3.2.1., nos programas de gestão de clínicas e hospitais veterinários Qvet® e Gurusvet® utilizados no HE, e na base de dados da UICB, construída em Microsoft® Office Excel 365 para Windows®.

Foram recolhidas 23 variáveis associadas ao meio ambiente e ao animal: freguesia; concelho; precipitação total mensal; género; castração; raça; idade; peso; número de animais coabitantes; estilo de vida; estatuto vacinal; tipo de vacina; casos referenciados; data da admissão; duração do internamento; quadro clínico; diagnóstico; teste laboratorial utilizado; alterações no exame físico; exames complementares de diagnóstico; tratamento; desfecho; follow-up.

A idade foi dividida em 3 categorias: cães jovens (< 1 ano); cães adultos (2-7 anos); cães seniores (≥ 8 anos).

O peso foi distribuído em 5 categorias: cães de porte muito pequeno (≤ 4kg); cães de porte pequeno (> 4 e <11 kg); cães de porte médio (≥ 11 kg e <26); cães de porte grande (≥ 26 e ≤ 45) e cães de porte gigante (> 45 kg).

De forma a investigar se a precipitação afetou o aparecimento de novos casos, consultou-se nos boletins climatológicos mensais do Instituto Português do Mar e da

Atmosfera (IPMA), a precipitação total mensal, registada na estação meteorológica de Lisboa de 2014 a 2019.

A análise exploratória e descritiva desses dados foi feita no Microsoft® Office Excel 365 para Windows®. A estatística inferencial, foi realizada no programa R x64 4.0.2 para Windows®. O intervalo de confiança utilizado foi de 95% em todas as análises, pelo que se considerou a diferença significativa quando $p < 0.05$.

O teste do qui-quadrado de Pearson, foi realizado para avaliar o desfecho e o diagnóstico, relativamente a outras variáveis categóricas, e quando as frequências esperadas eram inferiores a 5, foi realizado o teste exato de Fisher. Utilizou-se um modelo de regressão logística para determinar os *odds ratios*. No modelo final, foram incluídas todas as variáveis cuja análise univariada tinha uma significância de 0.2 (Hosmer and Lemeshow 2000).

Para avaliar que fatores afetaram o tempo de recuperação, foram construídas curvas de Kaplan-Meier e o teste log-rank para comparar as mesmas, e verificar se a diferença era significativa.

Para avaliar de que forma certas variáveis numéricas, afetaram o desfecho e o diagnóstico, inicialmente testou-se a normalidade da amostra, através do teste Shapiro-Wilk, considerando-se com distribuição normal valores de $p > 0.05$ e utilizaram-se nestes casos, o teste paramétrico t test para duas amostras independentes. Como teste não paramétrico, utilizou-se o Wilcoxon signed rank test.

3.2.3 Critérios de inclusão e métodos de diagnóstico

Foram incluídos no estudo todos os casos de suspeita da doença, baseados em critérios epidemiológicos e clínicos, compatíveis com o quadro de leptospirose canina.

Para que no diagnóstico os cães fossem classificados como positivos ou negativos, foram realizados, pelo menos, um dos seguintes testes laboratoriais: serologia para a pesquisa de anticorpos anti-leptospira IgG e IgM (em amostras de soro sanguíneo); PCR (sanguíneo ou urinário); MAT (em amostras de soro sanguíneo).

3.2.4 Anamnese e exame físico

Foram recolhidos os sinais clínicos mais relevantes, incluindo os apresentados pelo animal no dia da consulta no HE, e durante o internamento na UICB. Os dados do exame físico dos cães admitidos no HE, em consultas de segunda opinião e de referência, foram recolhidos de informação disponibilizada pela clínica/hospital referente e, posteriormente complementados, com os dados gerados no dia da consulta no HE e durante o internamento na UICB.

3.2.5 Exames complementares de diagnóstico

Foram registradas na base de dados informações relativas ao hemograma (eritrócitos, hematócrito, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas), às análises bioquímicas (albumina, proteínas totais, glicemia, ALT, AST, FAS, ureia e creatinina), à urianálise (glucose, bilirrubina, eritrócitos, proteína, leucócitos, cilindros e densidade urinária), ao ionograma (fósforo, cloro, sódio e o potássio) e a alterações no raio-X torácico, e na ecografia abdominal. Estes exames foram realizados, sempre que possível, no dia da admissão, durante o internamento, no dia da alta clínica e na consulta de reavaliação. Nos casos de cães referenciados, que já traziam resultados de análises sanguíneas, registraram-se esses valores, quando não foram repetidos no dia de admissão no HE.

Quando se realizou o rácio proteína/creatinina urinárias (rácio UPC), durante o internamento, esses resultados foram também registados.

3.2.6 Terapêutica

A terapêutica registada reporta a antibioterapia, anti-inflamatórios esteroides e não esteroides, protetores hepáticos, diuréticos, antiagregantes plaquetários e transfusões sanguíneas durante o período de internamento do animal.

3.2.7 Vacinação

Seguiram-se as recomendações do grupo de peritos em vacinação (Vaccination Guidelines Group), da Associação Veterinária Mundial de Pequenos Animais (WSAVA), para classificar o estatuto vacinal dos cães (Day et al. 2016). Tendo sido considerados com vacinação completa, os cães que tinham as vacinas nucleares em dia (raiva, parvovirose, esgana e hepatite). Esses cães podiam não estar vacinados contra a leptospirose, que é considerada pela WSAVA uma vacina opcional, sendo recomendada em áreas geográficas com risco de exposição estabelecido, ou em cães com um estilo de vida que os possa colocar em risco (Day et al. 2016). Consideraram-se cães com vacinação incompleta, quando se identificaram falhas na primovacinação ou no reforço ao ano de idade, ou nas revacinações trienais.

No caso da vacinação contra a leptospirose, consideraram-se imunizados os cães que receberam duas doses com 3 a 4 semanas de intervalo, a partir das 8 semanas de idade e revacinações anuais (Day et al. 2016).

4. Resultados

4.1 Descrição da população de cães internados na UICB

Dos 165 cães hospitalizados na UICB entre dezembro de 2013 e dezembro de 2019, 15 foram excluídos, por não terem um teste laboratorial conclusivo. Dos 150 cães, 55 (36,7%) foram positivos a leptospirose canina, e os restantes 95 (63,3%) negativos.

4.1.1 Género

Dos 55 cães com leptospirose, 29 (52,7%) eram machos e 26 (47,3%) fêmeas.

Quarenta e cinco animais (81,8%) eram inteiros(as) e 10 (18,2%) castrados/esterilizados.

Na Tabela 4 revelam-se os resultados da distribuição dos casos de leptospirose, de acordo com o género dos animais.

Tabela 4- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, de acordo com o género. N=150

Género	Leptospira positivo (n=55)		Leptospira negativo (n=95)	
	N	%	N	%
Feminino	26	36,1	46	63,9
Masculino	29	37,1	49	62,8

Não se identificou associação estatística significativa, entre o género e a ocorrência de leptospirose (Teste de Qui-quadrado de Pearson: $p=0,892$).

Na Tabela 5 reúnem-se os resultados da distribuição dos casos de leptospirose, de acordo com a castração dos machos.

Tabela 5- Distribuição dos cães machos, com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, internados na UICB, de acordo com a castração. N=78

Macho castrado	Leptospira positivo (n=29)		Leptospira negativo (n=49)	
	N	%	N	%
Sim	3	27,3	8	72,7
Não	26	38,8	41	61,2

Não se identificou associação estatística significativa, entre os cães machos serem castrados e a ocorrência de leptospirose (Teste exacto de Fisher: $p=0,524$).

Na Tabela 6 compilam-se os resultados da distribuição dos casos de leptospirose, de acordo com a esterilização das fêmeas.

Tabela 6- Distribuição das cadelas, com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, internadas na UICB, de acordo com a esterilização. N=72

Fêmeas esterilizadas	<i>Leptospira</i> positivo (n=26)		<i>Leptospira</i> negativo (n=46)	
	N	%	N	%
Sim	7	20,6	27	79,4
Não	19	50,0	19	50,0

Identificou-se uma associação estatística significativa entre as cadelas estarem esterilizadas e a ocorrência de leptospirose (Teste de Qui-quadrado de Pearson: $p=0,0095$). No modelo de regressão logística calculou-se um *odds ratio* de 0,26 ($p=0,0115$) para as cadelas esterilizadas *versus* as cadelas não esterilizadas. A esterilização das fêmeas surgiu assim como um fator de proteção da ocorrência de leptospirose.

Na Tabela 7 reúnem-se os resultados da distribuição dos casos de leptospirose, por género e de acordo com o desfecho clínico observado.

Tabela 7- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo de leptospirose, de acordo com o género e o desfecho clínico. N=55

Género	Sobreviventes (n=28)		Não sobreviventes (n=27)	
	N	%	N	%
Feminino	12	46,2	14	53,8
Masculino	16	55,2	13	44,8

Não se identificou associação estatística significativa, entre o género dos animais com leptospirose e o desfecho clínico (Teste exacto de Fisher: $p=0,504$).

4.1.2 Idade

Dos 55 cães positivos investigados, 9 (16,4%) eram jovens, 28 (50,9%) adultos e 18 (32,7%) seniores. Na Tabela 8 reúnem-se os resultados da condição de leptospirose, de acordo com a idade dos cães.

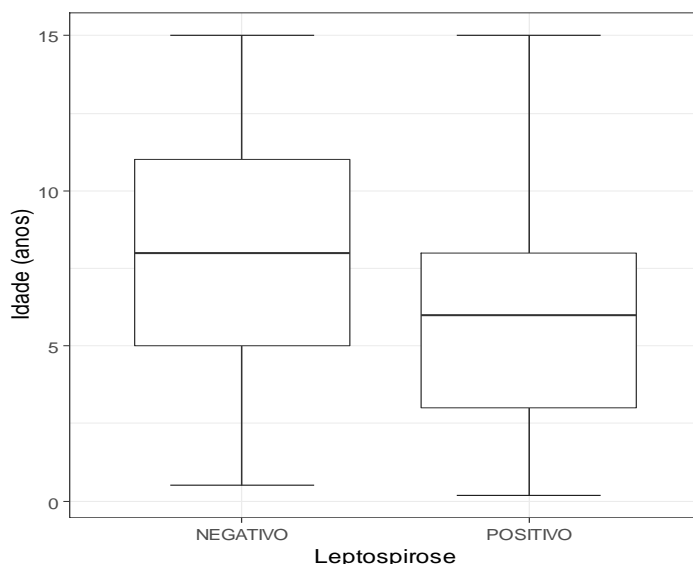
Tabela 8- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, de acordo com a idade. N=150

Idade	<i>Leptospira</i> positivo (n=55)		<i>Leptospira</i> negativo (n=95)	
	N	%	N	%
Jovem (0 a 1 ano)	9	16,4	9	9,3
Adulto (2 a 7 anos)	28	48,3	30	30,9
Sênior (≥ 8 anos)	18	24,3	56	57,7

Identificou-se uma associação estatística significativa entre a idade e a ocorrência de leptospirose (Teste de Qui-quadrado de Pearson: $p=0,008$).

O resultado do teste da normalidade de Shapiro-Wilk para a idade em anos foi de $p=0,015$, indiciando que a distribuição dos dados não é normal. A mediana da idade dos cães positivos a leptospirose foi de 6,0 anos, enquanto a mediana da idade dos cães negativos foi de 8,0 anos, com um valor de $p=0,0002$ (teste Wilcoxon), sendo por isso estatisticamente significativa. A média da idade dos cães positivos foi $5,6 \pm 3,2$ anos, com um mínimo de 2,4 meses e um máximo de 15,0 anos, enquanto os cães com diagnóstico negativo para leptospirose apresentavam uma média etária de $7,9 \pm 4,0$ anos, com um mínimo de 6,0 meses e um máximo de 15,0 anos (Gráfico 1).

Gráfico 1- Distribuição da idade (anos), dos cães internados na UICB, de acordo com o diagnóstico. N=150



Os cães pertencentes ao escalão sênior (idade ≥ 8 anos), apresentaram uma probabilidade 0,34 vezes inferior de contrair a doença, relativamente aos cães adultos

($p=0,005$). De fato, identificou-se uma associação estatística significativa entre o escalão etário e a ocorrência de leptospirose (Teste de Qui-quadrado de Pearson: $p=0,005$). No modelo de regressão logística calculou-se um *odds ratio* de 0,34 ($p=0,005$) para os cães seniores *versus* os cães adultos. O escalão etário sénior surgiu assim, como um fator de proteção da ocorrência de leptospirose.

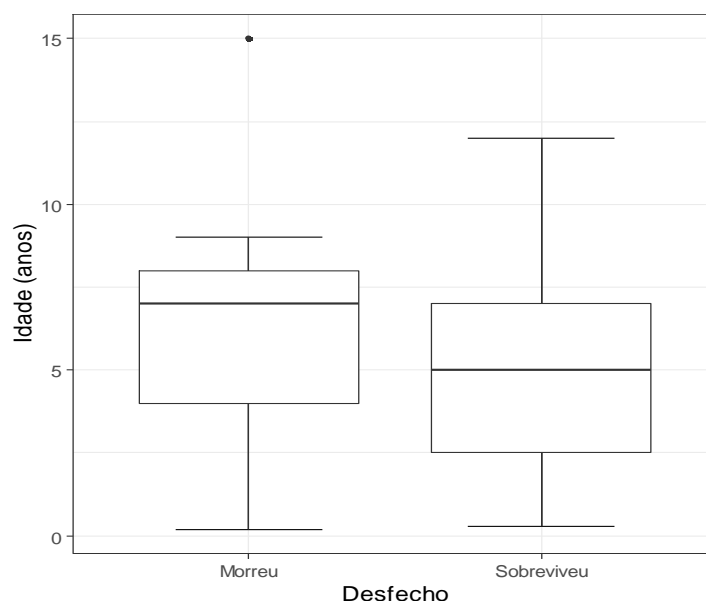
Na Tabela 9 são analisadas as variáveis idade e desfecho clínico nos cães com leptospirose.

Tabela 9- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo a leptospirose, de acordo com a idade e o desfecho. N=55

Idade	Sobreviventes (n=28)		Não sobreviventes (n=27)	
	N	%	N	%
Jovem (0 a 1 ano)	7	77,8	2	22,2
Adulto (2 a 7 anos)	16	57,1	12	42,9
Sénior (≥ 8 anos)	5	27,8	13	72,2

Identificou-se uma associação estatística significativa, entre a idade dos cães infetados e o seu desfecho clínico (Teste exacto de Fisher: $p=0,035$). O teste da normalidade Shapiro-Wilk para a idade (anos), confirmou que a distribuição não é normal ($p=0,01475$). A mediana da idade dos cães sobreviventes foi de 5,0 anos, enquanto que a mediana da idade dos cães que faleceram foi de 7,0 anos (Teste Wilcoxon: $p=0,03$). Esta diferença é estatisticamente significativa. A média da idade dos cães sobreviventes foi de $4,7 \pm 3,1$ anos, com um mínimo de 3,6 meses e um máximo de 12,0 anos, enquanto que para os cães não sobreviventes a média foi de $6,5 \pm 3,2$ anos, com um mínimo de 2,4 meses e um máximo de 15,0 anos (Gráfico 2).

Gráfico 2- Distribuição da idade (anos), dos 55 cães positivos a leptospirose, internados na UICB, de acordo com o desfecho.



4.1.3 Porte e peso

Relativamente ao porte dos 55 cães positivos, faltava esta informação em 5 cães. Três cães (6%) eram de porte muito pequeno, 5 (10%) de porte pequeno, 23 (46%) de porte médio, 16 (32%) de porte grande e 3 (6%) de porte gigante.

Na Tabela 10 indicam-se os valores da média, mediana, valores mínimo e máximo, e o desvio padrão do peso dos cães investigados.

Tabela 10- Média, mediana, máximo, mínimo e desvio padrão do peso dos cães infetados. N=55

Peso (kg)	Casos positivos
Média	21,9
Mediana	20,2
Máximo	53,0
Mínimo	2,8
Desvio padrão	11,8

O peso médio dos cães positivos foi $21,9 \pm 11,8$ kg, com um mínimo de 2,8 kg e um máximo de 53,0 kg. A mediana foi 20,2 kg.

Na Tabela 11 distribuiu-se os cães infetados, de acordo com o seu porte e o desfecho clínico.

Tabela 11- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo, de acordo com o porte e o desfecho clínico. N=50

Porte	Sobreviventes (n=26)		Não Sobreviventes (n=24)	
	N	%	N	%
Muito pequeno (≤ 4 kg)	1	33,3	2	66,7
Pequeno (> 4 e < 11 kg)	2	40,0	3	60,0
Médio (≥ 11 e < 26 kg)	13	56,5	10	43,5
Grande (≥ 26 e ≤ 45 kg)	9	56,2	7	43,8
Gigante (> 45 kg)	1	33,3	2	66,7

Não se identificou associação estatística significativa, entre o porte dos cães com leptospirose e o seu desfecho clínico (Teste exacto de Fisher: $p=0,836$). O teste da normalidade de Shapiro-Wilk, revelou uma distribuição normal para a variável peso ($p=0,1096$). O peso médio em kg, para os cães não sobreviventes foi de 23,7 kg, e para os cães sobreviventes de 20,3 kg, com um valor de $p=0,3195$ (t-test para duas amostras independentes). A média do peso do grupo dos cães que não sobreviveram à doença, não foi significativamente diferente da média do peso dos cães sobreviventes ($p>0,05$).

4.1.4 Raça

Trinta e quatro (61,8%) dos 55 cães positivos eram de raça determinada e 21 (38,2%) não tinham raça definida (Tabela 12).

Tabela 12- Raças de cães positivos a leptospirose (N=55)

Raça	N	%	Raça	N	%
American Staffordshire Terrier	1	1,8	Pastor Alemão	1	1,8
Bull Terrier	1	1,8	Podengo	2	3,6
Bulldog Americano	1	1,8	Pointer	1	1,8
Bulldog Francês	1	1,8	Rottweiler	2	3,6
Cane corso	1	1,8	Samoiedo	1	1,8
Caniche	2	3,6	Serra de Aires	1	1,8
Cão de Água Português	1	1,8	Setter Irlândes	1	1,8
Cão de Gado Transmontano	1	1,8	Sharpei	1	1,8
Dalmata	1	1,8	Teckel	3	5,5
Golden Retriever	1	1,8	Weimaraner	1	1,8
Labrador Retriever	9	16,4	Sem raça definida	21	38,2

Na Tabela 13 apresenta-se a frequência de cães infectados com *Leptospira* por raça.

Tabela 13- Distribuição dos cães, de acordo com a raça. N=150

Raça	Leptospira positivo (n=55)		Leptospira negativo (n=95)	
	N	%	N	%
Com raça determinada	34	37,4	57	62,6
Sem raça definida	21	38,2	34	61,8
Cruzado	0	0	4	100

Não se identificou associação estatística significativa, entre a raça dos cães e a ocorrência de leptospirose (Teste exacto de Fisher: $p=0,426$). Tal como entre a raça dos cães infectados e o desfecho clínico do episódio de leptospirose (Teste de Qui-quadrado de Pearson: $p=0,348$) (Tabela 14).

Tabela 14- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo de leptospirose, de acordo com a raça e o desfecho clínico. N=55

Raça	Sobreviventes (n=28)		Não sobreviventes (n=27)	
	N	%	N	%
Com raça determinada	19	55,9	15	44,1
Sem raça definida	9	42,9	12	57,1

4.1.5 Estilo de vida

Dos 55 cães positivos, em 5 animais (9,1%) não havia informação registada relativamente ao seu estilo de vida. Vinte e cinco cães (45,5%) tinham um estilo de vida misto (viviam no interior, mas com livre acesso ao exterior), 24 (43,6%) viviam maioritariamente no exterior, e 1 cão (1,8%) vivia predominantemente no interior, com acesso pontual e acompanhado pelos detentores ao exterior.

Na Tabela 15 apresenta-se a distribuição dos cães de acordo com o seu estilo de vida.

Tabela 15- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, de acordo com o estilo de vida. N=150

Estilo de vida	<i>Leptospira</i> positivo (n=55)		<i>Leptospira</i> negativo (n=95)	
	N	%	N	%
Misto	25	30,5	57	69,5
Exterior	24	49,0	25	51,0
Interior	1	100	0	0
Desconhecido	5	27,8	13	72,2

Não se identificou associação estatística significativa entre o estilo de vida dos cães e a ocorrência de leptospirose (Teste exacto de Fisher: $p=0,065$), mas o resultado obtido está próximo da significância.

4.1.6 Número de animais coabitantes

Dos 55 cães positivos, 29 (52,7%) não coabitavam com nenhum animal, 21 cães coabitavam com pelo menos 1 animal (38,2%). Não havia informação registada sobre os restantes 5 cães (Tabela 16).

Tabela 16- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo e negativo de leptospirose, de acordo com coabitação com outro animal de companhia. N=150

Coabita com outro animal	<i>Leptospira</i> positivo (n=55)		<i>Leptospira</i> negativo (n=95)	
	N	%	N	%
Sim	21	33,9	41	66,1
Não	29	34,9	54	65,1
Desconhecido	5	100	0	0

Não se identificou associação estatística significativa, entre a coabitação com outros animais de companhia e a ocorrência de leptospirose (Teste exacto de Fisher: $p=0,893$).

4.1.7 Vacinação

Não existia informação relativamente ao estatuto vacinal em 3 dos 55 cães infetados (5,5%). Doze (21,8%) não estavam vacinados. Dos 40 (72,7%) cães vacinados, apenas 14 (25,5%) estavam corretamente vacinados com vacinas *core* (parvovirose+esgana+hepatite canina), 24 cães (43,6%) tinham estas vacinas em atraso e 2 cães (3,6%) tinham a vacinação incompleta (Tabela 17).

Todos os cães infetados, mas com a vacinação completa, foram diagnosticados através da serologia IgM.

Tabela 17- Tipo de vacina administrada nos cães infetados com leptospirose. N=40

Tipo de vacina	Vacinação completa	Vacinação em atraso	Vacinação incompleta
Sem valência para leptospirose	1	0	1
Vacina leptospirose bivalente	5	5	0
Vacina leptospirose quadrivalente	1	2	0
Desconhecida	7	17	1

Na Tabela 18 apresenta-se a frequência de vacinação contra a leptospirose nos cães vacinados.

Tabela 18- Distribuição dos cães, de acordo com a vacinação para a leptospirose. N=60

Vacinação contra leptospirose	<i>Leptospira</i> positivo (n=26)		<i>Leptospira</i> negativo (n=34)	
	N	%	N	%
Vacinação em dia	6	30,0	14	70,0
Vacinação em atraso	7	35,0	13	65,0
Não vacinado	13	65,0	7	35,0

Metade dos cães infetados não estavam vacinados contra a leptospirose e 26,9% tinham o programa vacinal contra a leptospirose atrasado. Porém, não se identificou associação estatística significativa entre a vacinação contra a leptospirose e a ocorrência da doença (Teste de Qui-quadrado de Pearson: $p=0,054$), mas ressalva-se que o resultado está muito próximo da significância ($p=0,05$).

Na Tabela 19 apresentam-se as proporções de desfechos clínicos nos cães vacinados contra a leptospirose.

Tabela 19- Distribuição dos cães, com diagnóstico positivo de leptospirose, de acordo com o estado vacinal contra a leptospirose e o desfecho clínico. N=26

Vacinação contra a leptospirose	Sobreviventes (n=16)		Não sobreviventes (n=10)	
	N	%	N	%
Vacinação completa	6	100	0	0
Vacinação em atraso	4	57,1	3	42,9
Não vacinado	6	46,2	7	53,8

Não se identificou associação estatística significativa entre o estatuto vacinal de leptospirose e o desfecho clínico dos animais infetados (Teste exacto de Fisher: $p=0,098$).

4.1.8. Casos referenciados

Vinte e nove (52,7%) dos 55 cães infetados foram detetados em consultas de primeira opinião no HE, 2 (3,6%) em consultas de segunda opinião e 24 animais (43,6%) foram referenciados por outro médico veterinário para o HE.

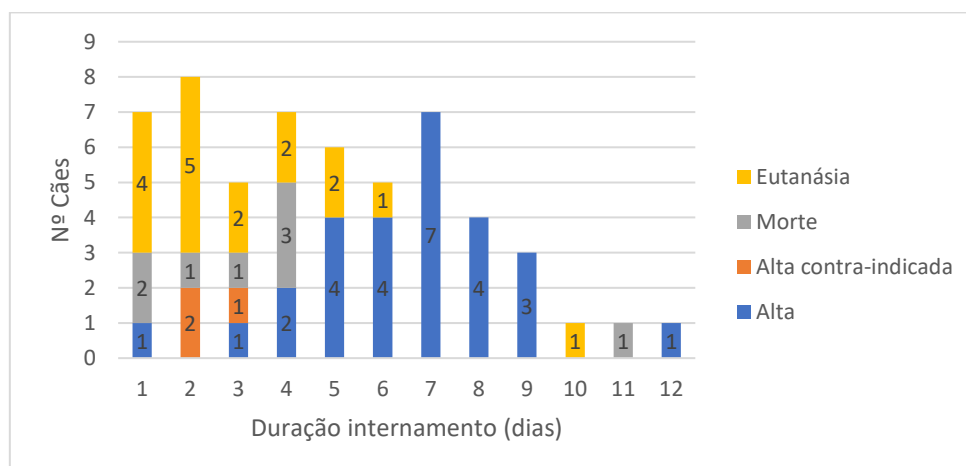
Não se identificou associação estatística significativa, entre o tipo de consulta e o desfecho clínico dos cães infetados (Teste exacto de Fisher: $p=0,576$).

4.1.9. Duração do internamento

Nos 55 cães infetados a duração média de internamento na UICB foi de $4,9 \pm 2,8$ dias, a mediana foi de 5,0 dias, o valor mínimo foi 1 dia de internamento e o máximo 12 dias.

O Gráfico 3 ilustra a duração do internamento e os desfechos clínicos dos cães infetados com leptospirose.

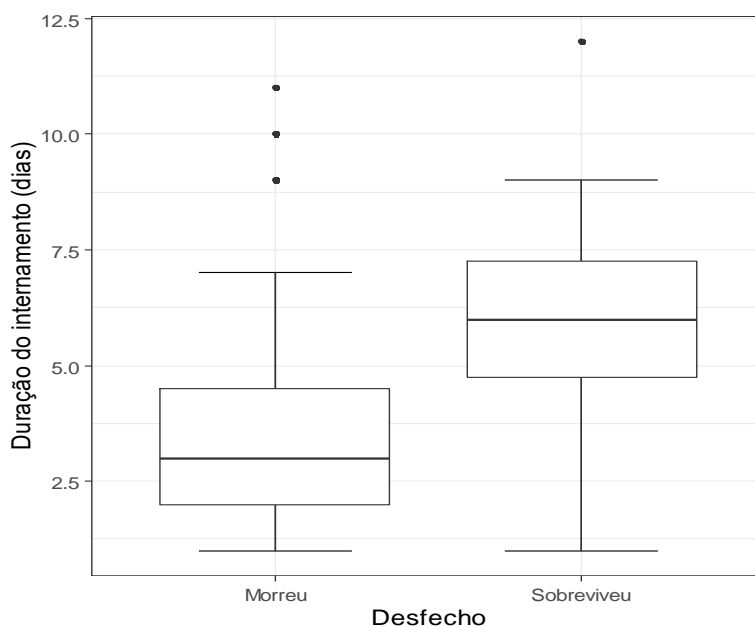
Gráfico 3 - Duração do internamento (em dias), e desfecho clínico dos cães infetados. N=55



O teste da normalidade de Shapiro-Wilk, revelou uma distribuição não normal para a duração do internamento ($p=0,018$). A média da duração do internamento dos cães que sobreviveram foi de $6,0 \pm 2,5$ dias, enquanto que a dos cães que não sobreviveram foi de $3,7 \pm 2,8$ dias. A mediana do número de dias de internamento nos cães sobreviventes foi de 6,0 dias, enquanto que para os cães não sobreviventes foi de 3,0 dias (Teste Wilcoxon: $p=0,001$), sendo esta diferença estatisticamente significativa (Gráfico 4).

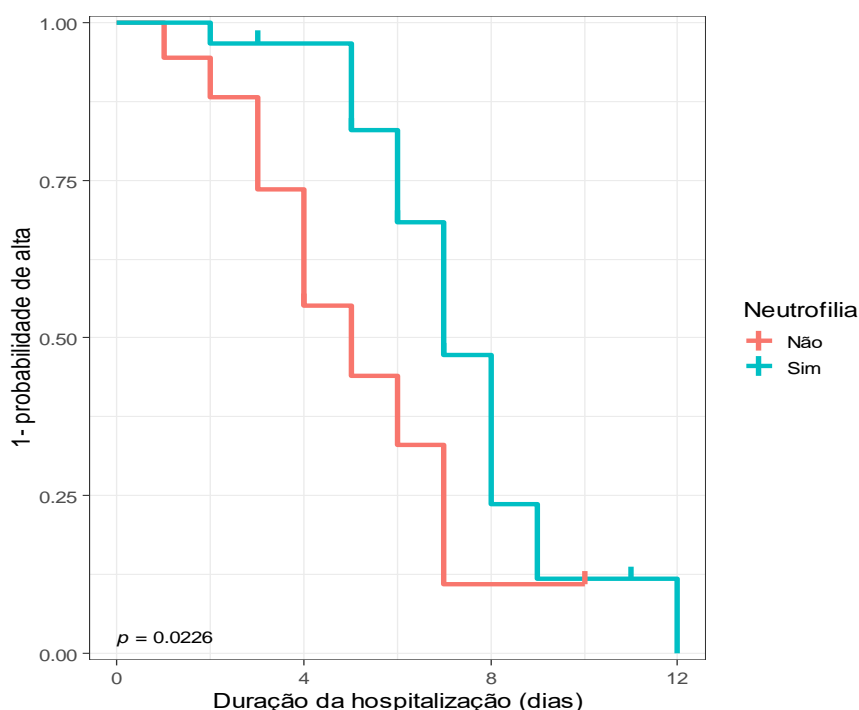
Um dos requisitos, na UICB, para conferir alta clínica aos cães infetados com leptospirose, é a realização do tratamento com doxiciclina em ambiente hospitalar, no mínimo durante 48 horas. Este requisito afetou os indicadores de duração do internamento.

Gráfico 4- Distribuição do número de dias de internamento nos cães infetados, de acordo com o desfecho clínico. N=55



Apenas a neutrofilia, afetou a duração do internamento (Log-rank test: $p<0,05$), verificando-se que os cães que apresentavam neutrofilia, tiveram uma maior probabilidade de não ter alta clínica no dia previsto relativamente aos restantes cães infetados (Gráfico 5).

Gráfico 5- Curvas Kaplan-Meier do número de dias até à alta clínica. 34 cães infetados com neutrofilia e 15 cães infetados sem neutrofilia.



A presença no exame físico de alterações gastrointestinais, renais, respiratórias e de alterações hemorrágicas, não afetou significativamente o número de dias até à decisão de dar alta clínica aos pacientes (Log-rank test: $p > 0,05$) (Anexo 2).

A presença de anemia, trombocitopenia, aumento da creatinina, aumento da ureia e aumento de pelo menos um dos parâmetros hepáticos (ALT, AST, FAS e/ou bilirrubina total), também não afetou significativamente o número de dias para a decisão de conferir alta clínica (Log-rank test: $p > 0,05$) (Anexo 2).

A ocorrência de alterações hepáticas ou renais na ecografia abdominal, ou de alterações no raio X torácico, tal como a utilização de doxiciclina no tratamento, também não afetou significativamente o número de dias para a ocorrência da alta (Log-rank test: $p > 0,05$) (Anexo 2).

4.1.10. Distribuição geográfica

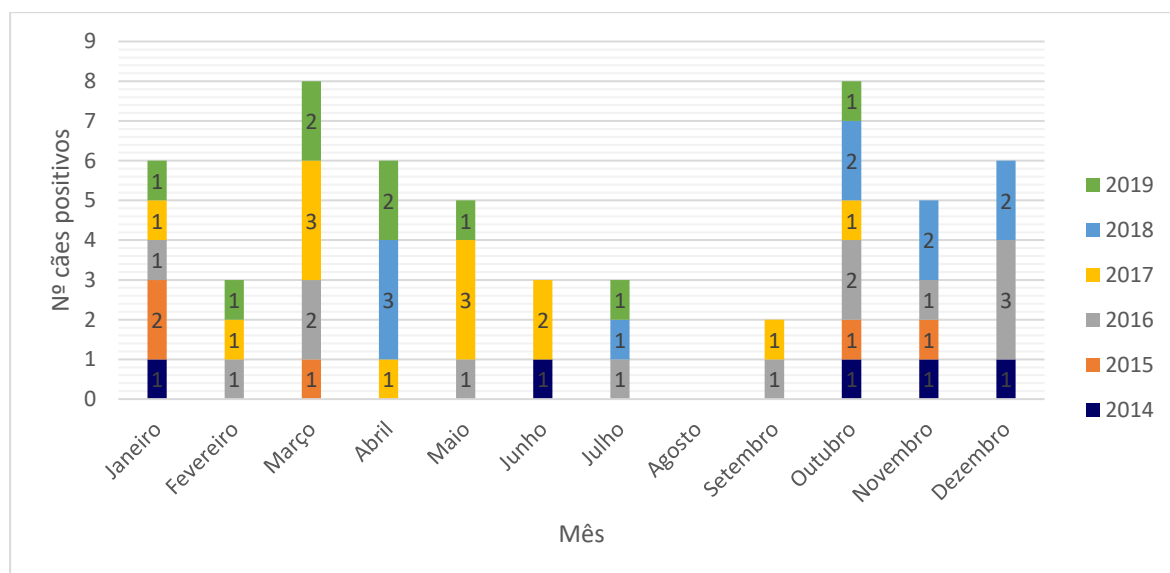
Dos 55 cães infetados, 48 (87,3%) residiam nos seguintes concelhos da Área Metropolitana de Lisboa: 13 (23,6%) em Lisboa, 8 (14,6%) em Oeiras, 7 (12,7%) em Cascais, 4 (7,3%) em Loures, 4 (7,3%) em Odivelas, 3 (5,5%) em Sintra, 3 (5,5%) na Amadora, 2 (3,6%) em Vila Franca de Xira, 2 (3,6%) em Almada, 1 (1,8%) em Mafra e 1 (1,8%) no Montijo.

Os restantes 7 cães infetados (12,7%), viviam nos concelhos de Ponte de Sor (2; 3,6%), Santarém (2; 3,6%), Alenquer (1; 1,8%), Rio Maior (1; 1,8%) e Porto (1; 1,8%).

4.1.11. Distribuição mensal e anual dos casos de leptospirose

No Gráfico 6 representa-se a dinâmica mensal e anual do diagnóstico de cães infectados com leptospirose.

Gráfico 6- Frequência mensal e anual dos casos de leptospirose no período de estudo. N=55



Observou-se uma variação anual de 0 a 3 casos por mês, tendo sido diagnosticados casos da doença nos seis anos investigados, e março e outubro foram os meses com mais internamentos de cães infectados.

Na Tabela 20, representa-se a sazonalidade do internamento de cães infectados com leptospirose no período de análise.

Tabela 20- Sazonalidade da distribuição dos cães internados. N=150

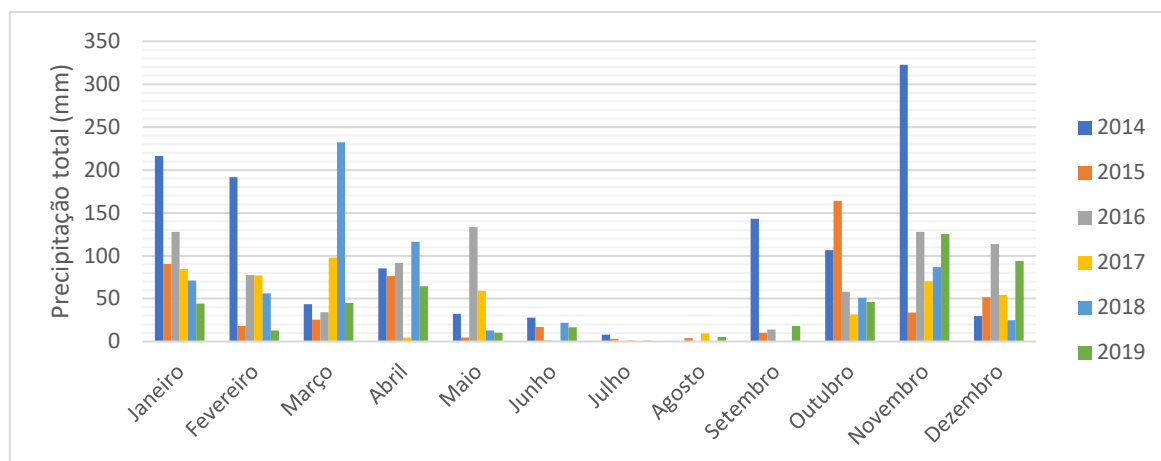
Estação	Leptospira positivo		Leptospira negativo	
	N	%	N	%
Outono	16	35,6	29	64,4
Inverno	19	47,5	21	52,5
Primavera	15	39,5	23	60,5
Verão	5	18,5	22	81,5

Destacando-se que no verão, a probabilidade de os cães contraírem a doença foi 0,25 vezes menor do que no inverno (modelo de regressão logística: Odds Ratio=0,25; p=0,019).

O Gráfico 7 foi construído com base em dados disponibilizados pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), e compila a precipitação total no sexénio investigado. O verão ter sido confirmado como fator de proteção da ocorrência de leptospirose canina, está muito

provavelmente associado à reduzida precipitação registada nesta estação do ano, que mitiga a transmissão de *waterborne diseases* como a leptospirose.

Gráfico 7- Precipitação (mm) total mensal de 2014 a 2019. Estação Meteorológica de Lisboa do IPMA (www.ipma.pt).



4.1.12. Tipo de teste laboratorial usado no diagnóstico

Os testes de diagnóstico utilizados nos 55 cães que testaram positivo para leptospirose, foram os seguintes: serologia de IgM (n=53; 96,4%); serologia de IgG (n=1; 1,8%); PCR em amostra de urina (n=1; 1,8%).

4.1.13. Sinais clínicos

A frequência dos sinais clínicos, apresentados pelos cães infetados no dia de admissão no HE e durante o internamento na UICB, está registada na Tabela 21.

Dos 55 cães positivos, observaram-se alterações gastrointestinais em 43 (78,2%), alterações hemorrágicas em 38 (69,1%), alterações renais em 25 (45,5%), alterações respiratórias em 18 (32,7%) e alterações oftalmológicas em 5 (9,1%) cães.

A média da frequência cardíaca foi de 128,6 batimentos por minuto (bpm), a mediana 120,0 bpm, o mínimo foi de 68,0 bpm e o máximo 244,0 bpm. A frequência cardíaca não teve uma distribuição normal (Teste da normalidade de Shapiro-Wilk: $p=0,01689$). A mediana da frequência cardíaca nos cães sobreviventes foi de 120,0 bpm, enquanto que nos cães não sobreviventes foi de 140,0 bpm. Esta diferença não é significativa (Wilcoxon test: $p=0,07$).

Quanto à frequência respiratória, a média foi 34,4 respirações por minuto (rpm), a mediana 28,0 rpm, a frequência respiratória mínima foi de 14,0 rpm e a máxima de 92,0 rpm. A frequência respiratória não teve uma distribuição normal (Teste da normalidade de Shapiro-Wilk: $p=0,00014$). A mediana da frequência respiratória, tanto para os cães sobreviventes

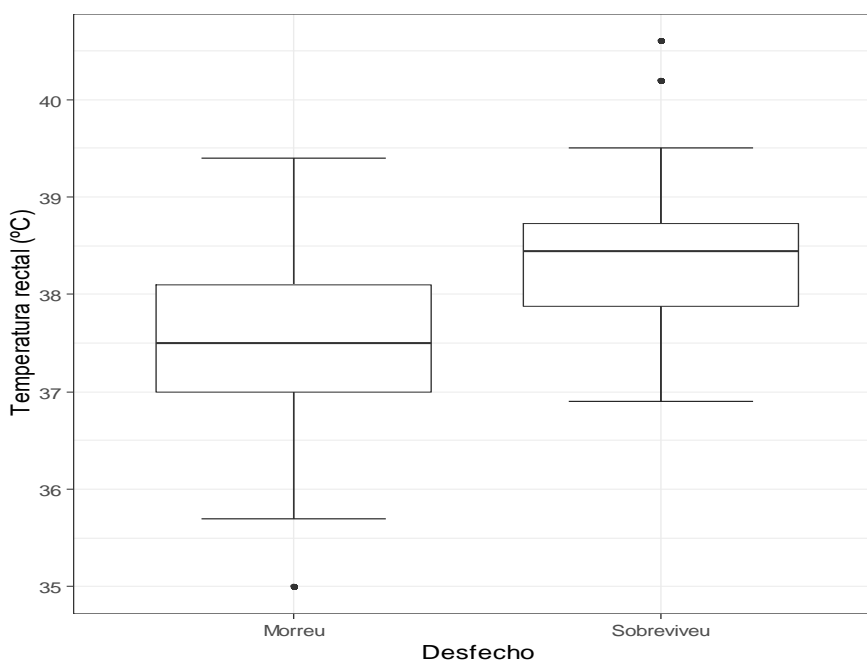
como para os não sobreviventes foi de 28,0 rpm, não se verificando uma diferença significativa (Wilcoxon test: $p=0,368$).

Tabela 21- Sinais clínicos apresentados pelos cães infetados, recolhidos no dia da admissão e no internamento na UICB. N=55

Sinais clínicos	N	%	Sinais clínicos	N	%
Alterações gastrointestinais			Dispneia	6	10,9
Vómito	40	72,7	Alterações Oftalmológicas		
Diarreia	22	40,0	Corrimento ocular	3	5,5
Alterações hemorrágicas			Nistagmus	1	1,8
Hematúria	22	40,0	Midríase	1	1,8
Hematoquécia	10	18,2	Quemose	1	1,8
Melena	10	18,2	Hifema	1	1,8
Hematemese	6	10,9	Outras alterações		
Petéquias	4	7,3	Anorexia	28	50,9
Epistáxis	2	3,6	Desidratação	18	32,7
Alterações Renais			Mucosas ictéricas	17	31,5
Oligoanúria	10	18,2	Hipotermia ($T<37,5^{\circ}\text{C}$)	14	25,5
Poliúria	9	16,4	Mucosas pálidas	13	24,1
Polidipsia	9	16,4	TRC$\geq 2''$	12	22,6
Alterações respiratórias			Dor abdominal	8	14,6
Taquipneia	22	40,0	Febre ($T>39^{\circ}\text{C}$)	7	12,7
Auscultação pulmonar alterada	7	12,7	Tremores	7	12,7
Corrimento nasal	7	12,7	Mucosas hiperémicas	4	7,3
Tosse	6	10,9	Perda de força membros posteriores	4	7,3

A temperatura rectal média foi de $38,0^{\circ}\pm 1,1^{\circ}\text{C}$, a mediana $38,0^{\circ}\text{C}$, a temperatura mínima registada foi de $35,0^{\circ}\text{C}$ e a máxima $40,6^{\circ}\text{C}$ (Gráfico 9). A temperatura rectal teve uma distribuição normal (Teste da normalidade de Shapiro-Wilk: $p=0,414$). A média da temperatura rectal nos cães sobreviventes foi de $38,5^{\circ}\text{C}$, enquanto que nos cães não sobreviventes foi de $37,5^{\circ}\text{C}$. Esta diferença é significativa (t-test para duas amostras independentes: $p=0,0005$).

Gráfico 8- Distribuição da temperatura rectal dos cães infetados, de acordo com o desfecho clínico. N=55



A distribuição dos sinais clínicos, de acordo com o desfecho clínico, observada nos cães infetados, está reunida na Tabela 22.

Tabela 22- Distribuição dos sinais clínicos, apresentados pelos cães infectados, de acordo com o desfecho clínico. N=55

Sinais clínicos	Sobreviventes n (%)	Não sobreviventes n (%)	Sinais clínicos	Sobreviventes n (%)	Não sobreviventes n (%)
Vômito	20 (50,0)	20 (50,0)	Corrimento ocular	1 (33,3)	2 (66,6)
Diarreia	8 (36,4)	14 (63,6)	Nistagmus	0	1 (100)
Hematúria	11 (50,0)	11 (50,0)	Midríase	0	1 (100)
Hematoquézia	3 (30,0)	7 (70,0)	Quemose	0	1 (100)
Melena	4 (40,0)	6 (60,0)	Hifema	0	1 (100)
Hematemese	4 (66,7)	2 (33,3)	Anorexia	13 (46,4)	15 (53,6)
Petéquias	2 (50,0)	2 (50,0)	Desidratação	11 (44,0)	14 (56,0)
Epistáxis	0	2 (100)	Mucosas ictéricas	7 (41,2)	10 (58,8)
Oligoanúria	0	10 (100)	Hipotermia	3 (21,4)	11 (78,6)
Poliúria	5 (55,6)	4 (44,4)	Mucosas pálidas	8 (61,5)	5 (38,5)
Polidipsia	5 (55,6)	4 (44,4)	TRC \geq 2"	5 (41,7)	7 (58,3)
Taquipneia	11 (50,0)	11 (50,0)	Tremores	3 (42,9)	4 (57,1)
Auscultação pulmonar alterada	3 (42,9)	4 (57,1)	Mucosas hiperémicas	1 (25,0)	3 (75,0)
Tosse	2 (33,3)	4 (66,6)	Perda de força membros posteriores	1 (25,0)	3 (75,0)
Dispneia	1 (16,7)	5 (83,3)	Corrimento nasal	3 (42,9)	4 (57,1)

Constatou-se uma associação estatística significativa, entre a presença de hipotermia e o desfecho clínico ($p < 0,05$). Os cães com hipotermia, apresentaram uma probabilidade de morte 5,7 vezes maior, em comparação com os cães que não apresentaram hipotermia (modelo de regressão logística: Odds Ratio=5,7; $p = 0,016$).

Evidenciou-se também uma associação estatística significativa, entre a presença de oligoanúria e o desfecho clínico (teste exato de Fisher: $p < 0,05$).

Relativamente aos restantes sinais clínicos, não se evidenciaram associações estatísticas com o desfecho clínico (Anexo 1).

4.1.14. Exames complementares

4.1.14.1. Hemograma

A Tabela 23 reúne os parâmetros do hemograma dos cães infetados.

Tabela 23- Parâmetros de hemograma, realizados nos cães infetados.

Parâmetro	Intervalo de referência (IR)	Nº de casos abaixo do IR	Nº de casos dentro do IR	Nº de casos acima do IR
Leucócitos (x/ μ L)	6-17	2/53 (3,8%)	16/53 (30,2%)	35/53 (66,0%)
Neutrófilos segmentados (/ μ L)	3000-11500	3/50 (6,0%)	13/50 (26,0%)	34/50 (68,0%)
Neutrófilos não segmentados (/ μ L)	0-300	0/39 (0%)	24/39 (61,5%)	15/39 (38,5%)
Eritrócitos (x/ μ L)	5,5-8,5	20/50 (40,0%)	28/50 (56,0%)	2/50 (4,0%)
Hematócrito (%)	37-55	21/54 (38,9%)	27/54 (50,0%)	6/54 (11,1%)
Hemoglobina (g/dl)	12-18	15/47 (31,9%)	25/47 (53,2%)	7/47 (14,9%)
Plaquetas (x/ μ L)	200-500	34/53* (64,2%)	16/53 (30,2%)	3/53 (5,6%)
Linfócitos (/ μ L)	1000-4800	11/46 (23,9%)	33/46 (71,7%)	2/46 (4,4%)
Monócitos(/ μ L)	150-1350	1/48 (2,1%)	27/48 (56,3%)	20/48 (41,7%)
Eosinófilos(/ μ L)	100-1250	24/46 (52,2%)	21/46 (45,7%)	1/46 (2,2%)

*Dos 34 hemogramas com registo de trombocitopenia, 14 apresentavam agregação plaquetária, (20/39=51,3%).

A Tabela 24 relaciona os achados do hemograma com o desfecho clínico dos cães infetados.

Tabela 24- Alterações no hemograma e desfecho clínico dos cães infetados. N=55

Alterações no hemograma	Sobreviventes (n=28)	Não sobreviventes (n=27)
Leucocitose	18 (51,4%)	17 (48,6%)
Neutrofilia	18 (52,9%)	16 (47,1%)
Anemia	10 (47,6%)	11 (52,4%)
Trombocitopenia	11 (55,0%)	9 (45,0%)
Linfopenia	7 (63,6%)	4 (36,4%)
Monocitose	11 (55,0%)	9 (45,0%)
Eosinopenia	14 (58,3%)	10 (41,7%)

Não se identificaram quaisquer associações estatísticas significativas (Anexo 1).

Finalmente, na Tabela 25 reporta-se a média e os valores mínimo e máximo dos parâmetros do hemograma dos cães infetados.

Tabela 25- Valores mínimo, máximo e média dos parâmetros do hemograma dos cães infetados. N=55

Parâmetro	Sobreviventes			Não sobreviventes		
	Média	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.
Leucócitos (x/μL)	22,3	2,7	73,8	21,8	9,1	40,9
Neutrófilos segmentados (/μL)	17765,8	1800	63468	18713,5	4716	32704
Hematócrito (%)	39,6	12,2	62,6	36,8	12,5	63,7
Plaquetas (x/μL)	198,5	8	579	263,2	60,5	556
Linfócitos (/μL)	1982,9	342	5292	2019,7	508	8100

De forma a comparar a média dos leucócitos e dos neutrófilos segmentados, com o desfecho clínico, foi realizado o teste Wilcoxon ($p>0,05$) (Anexo 3). Para comparar a média do hematócrito, das plaquetas e dos linfócitos, com o desfecho clínico foi realizado o t-test para duas amostras independentes, que também não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$) (Anexo 3).

4.1.14.2. Ionograma

Na Tabela 26 reunimos os parâmetros do ionograma dos cães infetados.

Tabela 26- Parâmetros de ionograma realizados nos cães infetados. N=55

Parâmetro	Intervalo de referência (IR)	Nº de casos abaixo do IR	Nº de casos dentro do IR	Nº de casos acima do IR
Fósforo (mg/dl)	2,5-6,8	0/4 (0%)	3/4 (75,0%)	1/4 (25,0%)
Sódio (mml/l)	144-160	10/19 (52,6%)	9/19 (47,4%)	0/19 (0%)
Potássio (mml/l)	3,5-5,8	6/31 (19,4%)	23/31 (74,2%)	2/31 (6,5%)
Cloro (mml/l)	109-122	12/19 (63,2%)	7/19 (36,8%)	0/19 (0%)

Na Tabela 27 apresentamos as alterações registadas nos ionogramas dos cães infetados e o seu desfecho clínico.

Tabela 27- Distribuição dos cães infetados, de acordo com as alterações no ionograma e o desfecho clínico.

Alterações no ionograma	Sobreviventes (n=28)	Não sobreviventes (n=27)
Hiperfosfatemia (n=1)	1 (100%)	0 (0%)
Hiponatremia (n=10)	4 (40,0%)	6 (60,0%)
Hipocaliemia (n=6)	4 (66,7%)	2 (33,3%)
Hipercaliemia (n=2)	0 (0%)	2 (100%)
Hipocloremia (n=12)	6 (50,0%)	6 (50,0%)

Não se evidenciou associação estatística significativa, entre a presença de alterações no ionograma e o desfecho clínico dos cães infectados (teste exato de Fisher: $p>0,05$) (Anexo 1).

Na Tabela 28, apresentamos a média e os valores mínimo e máximo dos parâmetros avaliados nos ionogramas dos cães infectados. Também não se evidenciou associação estatística significativa, relativamente à média do sódio com o desfecho clínico (teste Wilcoxon: $p>0,05$ e à média do fósforo, do potássio e do cloro com o desfecho clínico (t-test para duas amostras independentes: $p>0,05$) (Anexo 3).

Tabela 28- Valor mínimo, máximo e média dos parâmetros do ionograma e desfecho clínico dos cães infectados. N=55

Parâmetro	Sobreviventes			Não sobreviventes		
	Média	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.
Fósforo (mg/dl)	11,4	6,7	16,1	4,3	3,9	4,6
Sódio (mml/l)	140,9	132,0	153,0	142,1	104,0	157,0
Potássio (mml/l)	4,0	2,6	5,1	4,6	2,5	6,9
Cloro (mml/l)	101,0	76,0	118,0	102,3	77,0	120,0

4.1.14.3. Análises bioquímicas

As alterações verificadas nos parâmetros das análises bioquímicas, realizadas aos 55 cães com leptospirose, no dia da admissão, encontram-se registadas na Tabela 29.

Tabela 29- Parâmetros de bioquímicas, realizadas no dia da admissão, a cães positivos a Leptospirose, internados na UICB.

Parâmetro	Intervalo de referência (IR)	Nº de casos abaixo do IR	Nº de casos dentro do IR	Nº de casos acima do IR
Albumina (g/dl)	2,3-4	8/42 (19,1%)	33/42 (78,6%)	1/42 (2,4%)
Proteínas totais (g/dl)	5,2-8,2	2/35 (5,7%)	30/35 (85,7%)	3/35 (8,6%)
ALT (U/L 37º)	10-100	1/49 (2,0%)	21/49 (42,9%)	27/49 (55,1%)
AST (U/L 37º)	10-50	0/9 (0%)	0/9 (0%)	9/9 (100%)
FAS (U/L 37º)	23-212	4/44 (9,1%)	22/44 (50,0%)	18/44 (40,9%)
Bilirrubina total (mg/dl)	0-0,41	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)	9/11 (81,8%)
Glucose (mg/dl)	59,4-157	3/38 (7,9%)	33/38 (86,8%)	2/38 (5,3%)
Ureia (mg/dl)	12-56	1/51 (2,0%)	14/51 (27,5%)	36/51 (70,6%)
Creatinina (mg/dl)	0,62-1,64	2/52 (3,9%)	14/52 (26,9%)	36/52 (69,2%)

A Tabela 30 relaciona as alterações registadas nas análises bioquímicas com o desfecho clínico dos pacientes.

Tabela 30- Distribuição dos cães com leptospirose, internados na UICB, de acordo com as alterações nas análises bioquímicas e o desfecho.

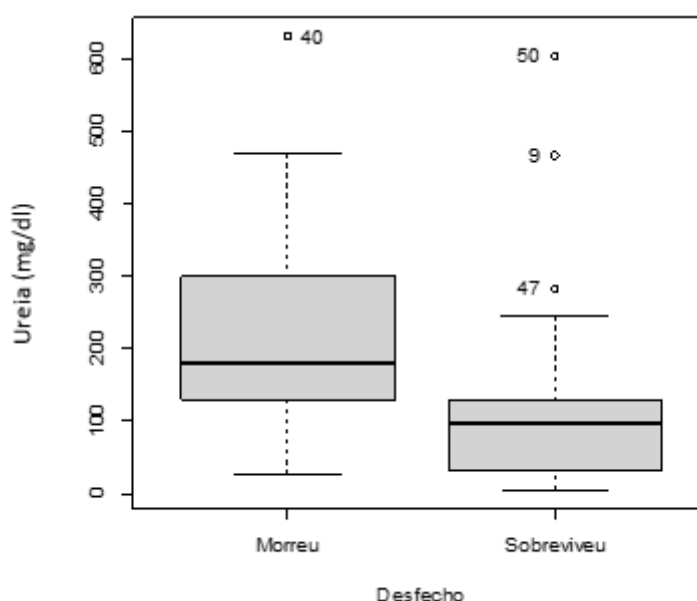
Alterações nas bioquímicas	Sobreviventes	Não sobreviventes
Hipoalbuminemia	5 (62,5%)	3 (37,5%)
Hipoproteinemia	2 (100%)	0 (0%)
Aumento ALT	15 (55,6%)	12 (44,4%)
Aumento da FAS	9 (50,0%)	9 (50,0%)
Hiperbilirrubinemia	3 (33,3%)	6 (66,7%)
Aumento da Ureia	15 (42,9%)	20 (57,1%)
Aumento da creatinina	14 (38,9%)	22 (61,1%)

Identificámos uma associação estatisticamente significativa, entre o aumento da creatinina e o desfecho clínico (teste do Qui-quadrado de Pearson: $p < 0,05$. Consultar Anexo 1). Os cães com a creatinina aumentada, apresentaram uma probabilidade de morte 4,71 vezes superior comparativamente com os restantes ($p = 0,021$). Modelo de regressão logística: *Odds ratio* = 4,71; ($p = 0,021$).

Dos 9 cães que realizaram a AST, todos apresentavam um valor aumentado. No teste Wilcoxon, verificou-se que a mediana da AST dos cães sobreviventes foi de 82 U/L, e a dos cães não sobreviventes de 80 U/L, com um valor de $p = 1$, não sendo por isso estatisticamente significativo.

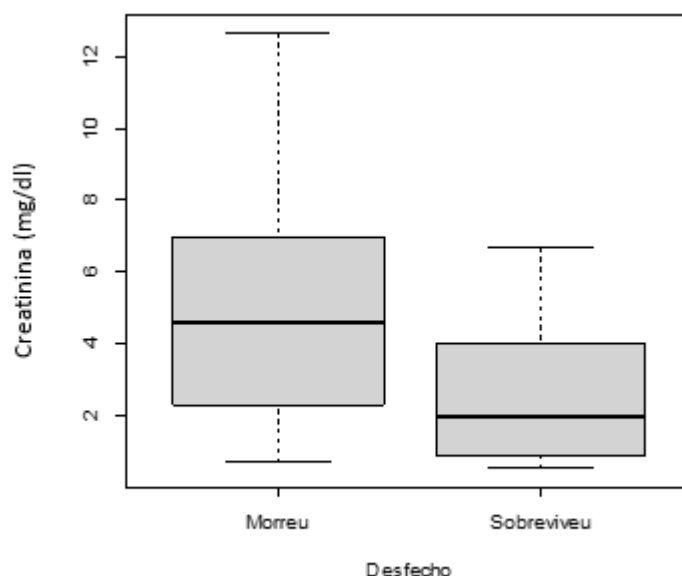
Ao invés, a mediana da creatinina para os cães sobreviventes foi de 2 mg/dl, enquanto que para os cães não sobreviventes foi de 4,6 mg/dl, observando-se uma diferença estatisticamente significativa (Teste Wilcoxon: $p = 0,003$) (Gráfico 9).

Gráfico 9- Distribuição dos valores da ureia (mg/dl), dos 55 cães positivos a leptospirose, internados na UICB de acordo com o desfecho



No caso da distribuição dos valores de ureia (Gráfico 10), a mediana foi de 98 mg/dl para os cães sobreviventes, e de 180 mg/dl nos cães que faleceram. Trata-se de uma diferença estatisticamente significativa (Teste Wilcoxon: $p=0,01$).

Gráfico 10- Distribuição dos valores da creatinina (mg/dl), dos 55 cães positivos a leptospirose, internados na UICB de acordo com o desfecho.



Nos restantes parâmetros das análises bioquímicas, não se observaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 30. Consultar Anexo 3).

Tabela 31- Valor mínimo, máximo e média dos parâmetros de bioquímicas, realizados no dia da admissão, a cães positivos a Leptospirose, internados na UICB.

Parâmetro	Sobreviventes			Não sobreviventes		
	Média	Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.
Albumina (g/dl)	2,8	1,7	4,0	2,7	1,8	6,0
Proteínas totais (g/dl)	6,6	1,1	9,4	7,2	5,5	8,8
ALT (U/L 37º)	158,1	8,0	468,0	141,9	30,0	1104,0
AST (U/L 37º)	91,3	60,0	132,0	113,5	51,0	278,0
FAS (U/L 37º)	313,7	56,0	1279,0	385,5	4,0	2000,0
Bilirrubina total (mg/dl)	11,2	0,3	21,8	12,0	0,1	26,9
Glucose (mg/dl)	115,2	61,0	294,0	95,5	40,0	178,0
Ureia (mg/dl)	128,1	4,0	604,5	216,1	25,0	630,9
Creatinina (mg/dl)	2,5	0,5	6,7	4,9	0,7	12,7

No dia da alta, foi avaliada a ALT em 7 cães, a ureia em 13 cães e a creatinina em 14 cães, dos quais os valores estavam aumentados em 4 (57,1%), 6 (46,2%) e 2 (14,3%), respectivamente.

Na consulta de reavaliação, a ALT foi estimada em 17 cães e verificou-se que estava aumentada em 7 (41,2%) casos, a ureia foi avaliada em 16 cães e estava aumentada em 4 (25,0%), e por fim, a creatinina foi avaliada em 17 cães, dos quais apenas um (5,9%) apresentava um valor aumentado.

4.1.14.4. Urinálise

Nos 55 cães positivos a leptospirose, foi feita a urinálise em 19, encontrando-se as principais alterações, registadas na Tabela 32 e distribuídas de acordo com o desfecho clínico. O rácio UPC, apenas foi realizado em 2 cães, e em ambos, o valor obtido foi superior a 0,5, tendo por isso sido classificados como proteinúricos.

Tabela 32- Distribuição dos cães positivos a leptospirose, de acordo com as alterações na urinálise e o desfecho.

Alterações na urinálise	Sobreviventes	Não sobreviventes	n (%)
Proteinúria	8 (44,4%)	10 (55,6%)	18 (94,7%)
Hematúria	5 (35,7%)	9 (64,3%)	14 (73,7%)
Piúria	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5 (26,3%)
Glicosúria	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7 (36,8%)
Bilirrubinúria	3 (50,0%)	3 (50,0%)	6 (31,6%)
Isostenúria (1,008-1,012)	0 (0%)	3 (100%)	3 (15,8%)
Hipostenúria (<1,008)	0 (0%)	1 (100%)	1 (5,3%)
Cilindrúria	2 (100%)	0 (0%)	2 (10,5%)

Não se evidenciaram associações estatisticamente significativas, entre alterações na urinálise e o desfecho clínico (Teste exato de Fisher: $p > 0,05$. Consultar Anexo 1).

4.1.14.5 Ecografia abdominal

Dos 55 cães positivos, 36 (65,5%) realizaram ecografia abdominal, estando a frequência das principais alterações compilada na Tabela 33.

Na Tabela 34, os cães infetados são distribuídos de acordo com as alterações visíveis nas ecografias e o desfecho clínico.

Não se evidenciaram associações estatisticamente significativas, entre a presença de alterações ecográficas e o desfecho clínico (Teste do Qui-quadrado de Pearson: $p > 0,05$. Consultar Anexo 1).

Tabela 33- Alterações na ecografia abdominal realizada em cães positivos a Leptospirose internados na UICB.

Ecografia abdominal	Frequência	Porcentagem
Alterações hepáticas e/ou da vesícula biliar	23/36	63,9%
Hepatomegalia	17/36	47,2%
Hipoecogenicidade hepática	14/36	38,9%
Lamas biliares	8/36	22,2%
Espessamento da parede da vesícula biliar	3/36	8,3%
Mucocelo biliar	1/36	2,8%
Alterações Renais	16/36	44,4%
Córtex renal hiperecogénico	9/36	25,0%
Perda da transição cortico-medular	6/36	16,7%
Atrofia renal	3/36	8,3%
Efusão retroperitoneal	2/36	5,6%
<i>Medullary rim sign</i>	2/36	5,6%
Renomegalia	2/36	5,6%
Pielectasia	1/36	2,8%
Nefrolitíase	1/36	2,8%
Quistos no córtex renal	1/36	2,8%
Hiperecogenicidade renal difusa	1/36	2,8%
Outras alterações	20/36	55,6%
Esplenomegalia	9/36	25,0%
Linfadenomegalia	7/36	19,4%
Espessamento parede gástrica	5/36	13,9%
Reatividade pancreática	4/36	11,1%
Ascite	3/36	8,3%
Espessamento parede intestinal	2/36	5,6%
Peritonite	2/36	5,6%

Tabela 34- Distribuição dos cães positivos a leptospirose, de acordo com as alterações na ecografia abdominal e o desfecho.

Ecografia abdominal	Sobreviventes	Não sobreviventes
Alterações na ecografia hepática e/ou da vesícula biliar	11 (47,8%)	12 (52,2%)
Alterações na ecografia renal	7 (43,8%)	9 (56,2%)

4.1.14.6 Radiografia torácica

Dos 18 (32,7%) cães positivos sujeitos a radiografia torácica, 8 (44,4%) apresentaram alterações, estando as frequências das mesmas, registadas na Tabela 35.

Tabela 35- Distribuição dos 18 cães positivos a leptospirose, de acordo com as alterações na radiografia torácica e o desfecho.

Radiografia torácica	Sobreviventes	Não sobreviventes	N (%)
Alterações na radiografia torácica	4 (50,0%)	4 (50,0%)	8 (44,4%)
Padrão intersticial não estruturado	4 (80,0%)	1 (20,0%)	5 (27,8%)
Padrão vascular	0 (0%)	1 (100%)	1 (5,6%)
Padrão bronco-intersticial	1 (100%)	0 (0%)	1 (5,6%)
Padrão interstício-alveolar	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2 (11,1%)
Linfadenomegália supra-esternal	1 (100%)	0 (0%)	1 (5,6%)
Padrão alveolar	0 (0%)	1 (100%)	1 (5,6%)
Padrão intersticial reticulo-nodular	0 (0%)	1 (100%)	1 (5,6%)

Um cão apresentava um padrão interstício-alveolar e interstício reticulo-nodular, disseminado por todo o parênquima pulmonar, mas com maior expressão no limite caudo-dorsal dos lobos caudais, com suspeita de pneumonia intersticial generalizada, e apresentava como alterações respiratórias: tosse, aumento do murmúrio vesicular à auscultação, dispneia mista, posição ortopneica e corrimento nasal. Noutro cão verificou-se a presença de um padrão intersticial e bronco-intersticial, nos lobos pulmonares caudais, com suspeita de pneumonia e apenas apresentava tosse. Verificou-se também num terceiro cão, um padrão intersticial e interstício-alveolar, com maior expressão na porção caudo-dorsal dos lobos caudais, com suspeita de pneumonia intersticial.

Não se evidenciaram associações estatisticamente significativas, entre a presença de alterações na radiografia torácica e o desfecho clínico (Teste do Qui-quadrado de Pearson: $p > 0,05$. Consultar Anexo 1).

4.1.15. Tratamento

Na Tabela 36 foi compilada a distribuição dos cães positivos a leptospirose, de acordo com o tratamento realizado e o desfecho clínico.

Tabela 36- Distribuição dos cães positivos a leptospirose, de acordo com o tratamento realizado e o desfecho.

Tratamento	Sobreviventes	Não sobreviventes	Total (%)
Ampicilina	24 (63,2%)	14 (36,8%)	38 (69,1%)
Doxiciclina	27 (75,0%)	9 (25,0%)	36 (65,5%)
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico	8 (47,1%)	9 (52,9%)	17 (30,9%)
Enrofloxacin	7 (58,3%)	5 (41,7%)	12 (21,8%)
Metronidazol	3 (33,3%)	6 (66,7%)	9 (16,4%)
Furosemida	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8 (14,6%)
Manitol	0 (0%)	4 (100%)	4 (7,3%)
Vitamina K	3 (60,0%)	2 (40,0%)	5 (9,1%)
Anti-inflamatórios não esteroides	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (10,9%)
Corticoterapia	4 (50,0%)	4 (50,0%)	8 (14,6%)

Foram ainda utilizados os seguintes fármacos: prednisolona (9,1%, 5/55); metilprednisolona (5,5%, 3/55); dexametasona (1,8%, 1/55); clopidogrel (3,6%, 2/55); protetores hepáticos (3,6%, 2/55) e ácido aminocaproico (1,8%, 1/55).

Dos 55 cães positivos, apenas 2 (3,6%) realizaram uma transfusão sanguínea, sendo que em ambos os casos, foi utilizado um concentrado de eritrócitos.

Através do valor de p, obtido no teste do Qui-quadrado de Pearson ou no teste exato de Fisher, evidenciou-se uma associação estatisticamente significativa, entre a realização do tratamento com a ampicilina, a doxícilina e a furosemida e o desfecho clínico ($p < 0,05$. Consultar o Anexo 1). No modelo de regressão logística, o *Odds ratio* nos cães que realizaram tratamento com doxícilina, ampicilina e furosemida relativamente aos cães que não foram sujeitos a estas terapêuticas, foi respetivamente de 0,02 ($p = 0,0002$), 0,18 ($p = 0,009$) e de 9,45 ($p = 0,043$).

4.1.16. Doenças concomitantes

Dos 55 cães infetados, 35 (63,6%) não tinham doenças concomitantes diagnosticadas. Relativamente aos restantes 20 cães (36,4%), as principais comorbilidades encontram-se registadas na Tabela 37.

Tabela 37- Distribuição dos cães com diagnóstico positivo a leptospirose de acordo com as doenças concomitantes. N=55

Doenças concomitantes	Cães infetados com leptospirose	
	N	%
Leishmaniose	5	9,1%
Rickettsiose	3	5,5%
Neoplasia	2	3,6%
Doença periodontal	2	3,6%
Babesiose	1	1,8%
Prostatite	1	1,8%

Todos os cães que apresentavam leishmaniose, rickettsiose, doença periodontal e neoplasia pertenciam ao escalão sénior (idade ≥ 8 anos).

4.1.17. Desfecho clínico

Relativamente ao desfecho clínico dos 55 cães positivos, 27 (49,1%) tiveram alta, 3 (5,5%) tiveram alta contraindicada, 17 (30,9%) foram submetidos a eutanásia e 8 (14,6%) morreram durante a hospitalização.

4.1.18. Seguimento

Em relação à consulta de reavaliação, após a alta clínica, verificou-se que dos 30 cães positivos que tiveram alta clínica, 9 (30,0%) faltaram à consulta de reavaliação, e dos 21 que foram reavaliados no HE, 8 (26,7%) melhoraram a sua condição, mas mantiveram alguns sinais clínicos; 7 (23,3%) estavam saudáveis; 2 (6,7%) tornaram-se doentes crónicos, 2 (6,7%) mantiveram a sua condição desde o dia da alta clínica e 2 (6,7%) morreram.

A taxa de sobrevivência foi de 50,9%.

5. Discussão

Este estudo contribuiu para a caracterização das apresentações clínicas de leptospirose canina no período investigado retrospectivamente, e para a identificação de possíveis fatores de risco, indicadores de prognóstico e de fatores que pareceram afetar o tempo de hospitalização.

5.1 Fatores de risco

A raça não foi identificada como um fator de risco de leptospirose, tal como noutros estudos publicados (Rentko et al. 1992; Birnbaum et al. 1998; Stokes et al. 2007; Duarte 2015), apesar de termos observado uma maior frequência de casos na raça Labrador Retriever (16,4%), o que está descrito noutros estudos (Ward et al. 2002; Cruz 2016). Isto pode ser explicado, pelo facto de serem cães de porte grande, com mais acesso ao exterior, e por isso mais expostos ao contacto com espiroquetas na urina de roedores ou em águas estagnadas.

No presente estudo, o género não foi um fator de risco de ocorrência de leptospirose. De fato, o número de fêmeas infetadas foi semelhante ao de machos, como ocorrido noutros estudos (Birnbaum et al. 1998; Stokes et al. 2007; Gautam et al. 2010; Knöpfler et al. 2017). Todavia, está descrito que os machos inteiros têm maior risco de contrair a infeção, porque apresentam normalmente mais comportamentos de risco, ao cheirarem a urina de outros cães para marcação de território (Adin and Cowgill 2000; Ward et al. 2002; Ward et al. 2004; Major et al. 2014), a castração dos machos também não foi identificada como um fator de risco na nossa investigação, mas a proporção de machos castrados está sub-representada na população investigada.

As cadelas esterilizadas apresentaram uma probabilidade 0,26 vezes menor de contrair leptospirose do que as cadelas inteiras. Isto pode dever-se ao facto de exibirem menos comportamentos de risco, como por exemplo cheirar a urina de outros cães ou afastarem-se mais do local de residência durante o cio.

Verificou-se uma maior frequência de leptospirose nos cães de porte médio e grande, comparativamente aos cães de porte pequeno, o que é concordante com a bibliografia consultada (Adin and Cowgill 2000; Major et al. 2014). Isto pode ser explicado, pelo facto dos cães de maior porte, normalmente passarem mais tempo no exterior e por isso estarem mais expostos à urina de roedores e/ou a fontes de água contaminadas.

A idade revelou-se um fator de risco ($p=0,008$), com os cães adultos (entre os 2 e os 7 anos) a revelarem uma maior proporção de leptospirose, tal como descrito em outros estudos (Ward 2002; Ward et al. 2004; Duarte 2015). Apesar de terem sido hospitalizados na UICB cães com leptospirose de todas as faixas etárias, verificámos que os cães seniores (idade ≥ 8 anos), apresentaram uma probabilidade 0,34 vezes menor de contrair a doença do que os cães adultos ($p=0,005$), tal como foi descrito por Gautam et al. (2010). Isto pode resultar de os cães mais velhos, serem menos ativos e passarem mais tempo no local onde habitam, não se expondo tanto como os cães adultos. Num estudo realizado na Suíça, constatou-se uma maior incidência de leptospirose em cães com menos de um ano, e uma menor incidência em cães com mais de 10 anos. A mediana etária dos cães afetados foi de 6,3 anos, o que está de acordo com o nosso estudo, com exceção dos cães com menos de 1 ano, que não apresentaram uma maior incidência (Major et al. 2014).

Surpreendentemente, o estilo de vida e o estatuto vacinal não se revelaram fatores de risco ($p=0,0647$ e $p=0,096$; respetivamente). Contudo, verificou-se que a maioria dos cães infetados, tinham um estilo de vida misto (45,5%) ou de exterior (43,6%), ou seja, com acesso ao exterior e apenas um cão vivia predominantemente no interior. Como os cães com estilo de vida exclusivamente de interior, estão sub-representados na população investigada na UICB, seria necessário realizar um estudo epidemiológico com uma amostragem representativa de cães nesta categoria, para aferir se o estilo de vida é de facto um fator protetor, relativamente a apresentarem um estilo de vida misto ou de exterior. Isto está de acordo com o descrito por Lança (2011), onde 55,6% dos cães tinham um estilo de vida misto, 39,0% exclusivamente de exterior e apenas um cão exclusivamente de interior.

Num estudo retrospectivo de leptospirose canina, realizado na região do Baixo Vouga, entre 2011 e 2015, verificou-se uma maior incidência de casos em cães com idade entre os 2 e os 8 anos, estilo de vida misto e que coabitavam com outros animais (Cruz 2016). Os resultados do presente estudo, são concordantes, exceto a variável coabitação com outros animais.

Relativamente à vacinação, dos 14 cães com a vacinação contra a leptospirose em dia, só metade tinha registado na ficha clínica, o tipo de vacina utilizado. Todos os cães com a vacinação em dia, foram diagnosticados através da serologia IgM, cujo título após a vacinação se apresenta muito baixo ou negativo, ao contrário do que acontece com os títulos

de IgG, que aumentam bastante após a vacinação, e por isso, nestes 14 casos é muito pouco provável que a vacinação tenha interferido com o diagnóstico (Greene et al. 2012).

Um cão fora vacinado com uma vacina *core* que incluía 4 estirpes de leptospira inativadas, cinco cães com uma vacina *core* com duas estirpes de leptospira inativadas e um cão com uma vacina *core* sem a valência para a leptospirose. Não detetámos associação estatística entre os cães estarem vacinados contra a leptospirose e a ocorrência da doença, apesar de se verificar uma maior frequência de leptospirose nos cães não vacinados. Tendo em conta a limitação referida da falta de registos em metade dos cães hospitalizados, não é possível fazer extrapolações sobre a eficácia da vacinação. Em dois estudos recentes, está descrito que 60 e 80%, respetivamente dos cães diagnosticados com leptospirose, tinham sido vacinados com a vacina bivalente (serovares *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae*) nos últimos 12 meses (Geisen et al. 2007; Knöpfler et al. 2017). Isto pode refletir a infeção por outros serovares (Levett 2001; Adler and Klaasen 2015).

Verificou-se que nos 150 cães incluídos neste estudo, 30 (20,0%) foram vacinados com a vacina *core* com duas estirpes de leptospira inativadas e 10 (6,7%) com a vacina *core* com quatro estirpes de leptospira inativadas. Como em Portugal, não existem estudos recentes de prevalência dos serovares, é recomendável que se utilize a vacina quadrivalente (serovares Copenhageni, Portland-vere, Bratislava e Dadas), porque confere um maior espetro de proteção, comparativamente com a vacina bivalente (serovares *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola*) (Sykes 2014; Schuller et al. 2015). A identificação dos principais serovares infetantes em cães com leptospirose, através da caracterização epidemiológica, é essencial para garantir uma proteção vacinal mais eficaz (Scanziani et al. 2002; Adler and Klaasen 2015).

Observámos uma menor frequência de casos entre junho e setembro (verão), sendo que no mês de agosto não se registaram casos; e uma maior incidência em março de 2017, abril de 2018, maio de 2017 e dezembro de 2016. A frequência de cães hospitalizados na UICB foi sempre superior no inverno e relativamente similar no outono e na primavera, o que está de acordo com a ocorrência de uma maior precipitação, tal como descrito em muitos estudos (Adin and Cowgill 2000; Sykes 2014; Duarte 2015). No verão, a probabilidade de um cão contrair a doença e ser internado na UICB foi 0,25 vezes menor do que no inverno ($p=0,019$).

5.2 Diagnóstico

Apesar de o teste recomendado para o diagnóstico de leptospirose ser o MAT, neste estudo, constatámos que o MAT não foi usado e que foram utilizados testes serológicos para detetar anticorpos IgG e IgM (Greene et al. 2012; Sykes 2014; Ettinger et al. 2017; Reagan and Sykes 2019). Isto pode ser explicado pelo facto de o MAT, para evitar falso-positivos em

cães vacinados recentemente, e falso-negativos na fase aguda da doença (por não se desenvolverem anticorpos suficientes), exigir que se façam testes na fase aguda e de convalescença (Midence et al. 2012; Martin et al. 2014; Sykes 2014; Reagan and Sykes 2019). Para além do MAT levar mais tempo para se obter o resultado (cerca de uma semana), comparativamente com a serologia IgG e IgM, é também mais caro, o que acaba por ser uma desvantagem operacional porque a leptospirose é uma doença aguda, que beneficia de uma abordagem mais precoce, com a administração da antibioterapia adequada. Além disso, em muitos casos há contenção económica por parte dos detentores dos cães, que não aceitam o custo adicional da testagem na fase de convalescença. Porém, o MAT tem a vantagem em relação ao PCR e à serologia IgG e IgM, de identificar o serogrupo, o que tem interesse em termos epidemiológicos, para saber se o serogrupo em causa está englobado nas vacinas disponíveis em Portugal. O ELISA tem a vantagem de fornecer o resultado em 24 horas, ao testar IgG e IgM em paralelo diferencia resultados falso-positivos induzidos por vacinação de infeções naturais e apresenta elevada sensibilidade numa fase precoce da doença (Geisen et al. 2007). Com a utilização do PCR obtém-se o resultado em menos de 48 horas, e um resultado positivo é altamente sugestivo da doença, não parecendo ser afetado por vacinação recente. Contudo tem as desvantagens de poderem ocorrer falso-negativos, quando a antibioterapia já foi iniciada, e de um resultado negativo não excluir a possibilidade de doença (Greene et al. 2012; Schuller et al. 2015).

Neste estudo, consideraram-se infetados os cães que testaram positivo apenas para a serologia de IgM, com sinais clínicos, dados epidemiológicos, imagiológicos e analíticos compatíveis com leptospirose, apesar de na bibliografia estar recomendado que, para além da serologia de anticorpos IgM, se deva ter um resultado positivo no MAT ou no PCR para obter um diagnóstico definitivo (Reagan and Sykes 2019), e essa é uma fragilidade.

O recomendado é fazer a serologia IgG e IgM, enquanto se aguarda os resultados do PCR ou preferencialmente do MAT, mas como na maioria dos casos há contenção de custos por parte dos detentores, e a hospitalização e a terapêutica nestes casos são dispendiosas, e considerando que os anticorpos IgM se encontram aumentados na fase inicial da doença, obtermos um resultado positivo é altamente sugestivo de leptospirose, quando associado a um quadro clínico compatível (Greene et al. 2012). Em Portugal, é possível realizar o MAT no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), para pesquisa de anticorpos leptospirais (Deliberação nº 607/2015 de 23 de abril).

O cão que testou positivo para IgG, não se encontrava vacinado nos últimos quatro anos, sendo por isso improvável que os anticorpos detetados fossem de origem vacinal, e como o quadro clínico apresentado era compatível com leptospirose, foi considerado positivo.

No cão que testou positivo no PCR na urina, deve colocar-se a possibilidade de ser um portador renal crónico, contudo, como apresentava um quadro clínico agudo compatível

com leptospirose, é mais provável que se tenha tratado de uma infeção aguda (Schuller et al. 2015; Ettinger et al. 2017).

5.3 Indicadores de prognóstico

O género ($p=0,504$), o porte ($p=0,836$), a raça ($p=0,348$) e o tipo de consulta ($p=0,576$), não influenciaram de forma significativa o desfecho clínico, a idade sim ($p=0,035$), com os cães seniores (idade ≥ 8 anos), a apresentaram maior mortalidade associada aos episódios clínicos de leptospirose, que pode ser explicada por outros problemas de saúde concomitantes. Num estudo realizado recentemente, não se observaram diferenças estatisticamente significativas, entre os cães positivos que sobreviveram à leptospirose e os que faleceram relativamente à idade, ao peso e ao género (Knöpfler et al. 2017).

O estatuto vacinal não afetou o desfecho clínico ($p=0,098$), apesar de todos os cães com vacinação completa contra a leptospirose, terem sobrevivido. Mas a casuística foi muito reduzida, e a qualidade dos registos sobre o tipo de vacinas utilizadas, muito limitada.

Os sinais clínicos que afetaram o desfecho de forma significativa, foram a ocorrência de oligoanúria ($p=0,0002$) e de hipotermia ($p=0,011$). Os cães com hipotermia, apresentaram uma probabilidade de morte 5,73 vezes maior do que os restantes cães ($p=0,016$).

Knöpfler et al. (2017) reportaram que a oligúria, a icterícia e o aumento do tempo de repleção capilar (superior a 2 segundos), estão associados significativamente a cães que não sobrevivem. No presente estudo, só constatámos essa associação relativamente à oligúria.

Também nenhuma das alterações observadas nos parâmetros do hemograma e do ionograma, influenciaram significativamente o desfecho da doença. Verificou-se que 55% dos cães com trombocitopenia sobreviveram, e 45% faleceram, não havendo uma diferença significativa, o que está de acordo com o descrito em outro estudo realizado em Portugal, na Área Metropolitana de Lisboa (Duarte 2015). Contudo, também está descrita uma maior incidência de trombocitopenia nos cães não sobreviventes, comparativamente com os sobreviventes (Knöpfler et al. 2017). A trombocitopenia está associada a um pior prognóstico, devido à gravidade das alterações respiratórias (Kohn et al. 2010; Greene et al. 2012).

Neste estudo não foi isso que verificámos, possivelmente porque dos 34 cães com trombocitopenia, 19 apresentavam agregação plaquetária, não podendo ser estes últimos valores utilizados (não se sabe se a trombocitopenia é de facto real, ou é só devida a agregação plaquetária, devido a um erro na técnica de recolha da amostra), podendo haver uma subvalorização da trombocitopenia real nos cães não sobreviventes. Para além disso, apenas se registaram os valores do hemograma na admissão na UICB, havendo a possibilidade de alguns cães terem desenvolvido trombocitopenia, numa fase mais avançada da hospitalização.

A frequência de anemia foi semelhante no grupo dos cães sobreviventes e não sobreviventes, o que está de acordo com o publicado por Knöpfler et al. (2017)

Está descrito que os cães que desenvolvem quadros pulmonares durante a hospitalização, têm uma probabilidade 4,5 vezes maior de morte (Kohn et al. 2010; Duarte 2015). No nosso estudo não evidenciámos essa associação.

Relativamente às análises bioquímicas, apenas o aumento da creatinina ($p=0,016$) afetou o desfecho clínico de forma significativa, verificando-se uma diminuição da taxa de sobrevivência. Os cães com a creatinina aumentada, tiveram uma probabilidade de morte 4,7 vezes superior, comparativamente aos restantes ($p=0,021$). Verificámos também, que quanto maior o valor da creatinina e da ureia, pior o prognóstico, devido a uma associação significativa da mediana da ureia e da creatinina entre os cães sobreviventes e os não sobreviventes, o que é concordante com outros estudos, que reportam pior prognóstico em cães infetados com leptospirose e com azotemia grave, comparativamente aos que apresentavam uma azotemia ligeira a moderada (Rentko et al. 1992; Birnbaum et al. 1998; Adin and Cowgill 2000; Mastroilli et al. 2007; Knöpfler et al. 2017).

Está descrito em cães com leptospirose, que os valores da AST são superiores no grupo de cães não sobreviventes, comparativamente com os sobreviventes, apesar da AST não ser considerada um indicador específico de função hepática, pois também se encontra no miocárdio e no musculo esquelético, e o seu aumento pode ocorrer em casos de lesão muscular (Knöpfler et al. 2017). Neste estudo, todos os cães que realizaram a AST tinham um valor aumentado, e a mediana da AST entre os cães sobreviventes e os não sobreviventes foi semelhante, contudo a casuística é muito reduzida ($n=9$) para se poderem inferir conclusões.

Nenhuma das alterações nos parâmetros da urianálise, da ecografia e da radiografia torácica influenciaram o desfecho final da doença (consultar o Anexo IV).

Apenas dois cães realizaram o rácio UPC, verificando-se que estavam proteinúricos. Ambos foram submetidos a eutanásia, por apresentarem um quadro de insuficiência renal muito grave. Segundo Mastroilli et al. (2007), o aumento do rácio UPC, é um indicador de mau prognóstico.

5.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos mais frequentes foram o vômito (72,7%), a anorexia (50,9%), a diarreia (40,0%) e a hematuria (40,0%), o que é concordante com publicações recentes, no caso do vômito descrito entre os 69% e os 88%, e da diarreia entre os 29% e os 50% (Adin and Cowgill 2000; Kohn et al. 2010; Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017). A frequência de anorexia está um pouco abaixo do mencionado noutros estudos, com frequências entre os

68% e os 88% (Adin and Cowgill 2000; Kohn et al. 2010; Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017).

Outros estudos reportam uma frequência de hematúria entre 6% a 31% (Birnbaum et al. 1998; Geisen et al. 2007), que se encontra um pouco abaixo do valor obtido por nós, o que pode ser explicado por além dos sinais clínicos apresentados no dia de admissão, incluímos os apresentados durante todo o período de hospitalização do animal.

A frequência de alterações renais no presente estudo, é inferior à descrita por Major et al. (2014). As alterações renais observadas foram a oligoanúria (18,2%), a poliúria e a polidipsia (16,4%), encontrando-se por isso com as frequências inferiores às descritas em outros estudos, situadas entre os 27% e os 54% para a oligoanúria e 50% para a poliúria e a polidipsia (Birnbaum et al. 1998; Adin and Cowgill 2000; Kohn et al. 2010; Major et al. 2014; Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017).

Também se verificou uma menor frequência (32,7%) de alterações do aparelho respiratório, comparativamente com estudos realizados na Alemanha e na Suíça, verificando-se respetivamente uma incidência de 62% e 68,8% (Kohn et al. 2010; Major et al. 2014). Duarte (2015) realizou um estudo retrospectivo na Área Metropolitana de Lisboa, onde verificou que na consulta de admissão, 7% dos cães apresentavam dispneia, 7% taquipneia e 14% alterações na auscultação pulmonar, sendo estes valores inferiores aos nossos resultados: 40,0% para a taquipneia; 12,7% para a auscultação pulmonar alterada; 10,9% para a dispneia. Contudo, recordamos que no presente estudo, para além dos sinais clínicos apresentados na consulta de admissão, foram considerados os sinais clínicos observados durante todo o período de hospitalização do animal, o que pode explicar esta diferença.

Outros sinais clínicos apresentados ao exame físico foram: a desidratação (32,7%), as mucosas ictéricas (31,5%), a hipotermia (25,5%), as mucosas pálidas (24,1%), o TRC superior ou igual a 2 segundos (22,6%), a dor à palpação abdominal (14,6%) e a febre (12,7%), relativamente às seguintes frequências descritas noutros estudos: entre 31% a 36% para a desidratação; 10 a 45% para as mucosas ictéricas; 6% a 22% para a hipotermia; 10% a 17% para as mucosas pálidas; 12% a 18% para um TRC maior ou igual a 2 segundos; 19 a 42% para a dor à palpação abdominal; 8 a 36% para a febre (Birnbaum et al. 1998; Adin and Cowgill 2000; Geisen et al. 2007; Goldstein 2010; Kohn et al. 2010; Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017).

Verifica-se por isso que na maioria dos sinais clínicos, as frequências foram semelhantes, e as diferenças encontradas em algumas situações podem dever-se a registos clínicos menos detalhados, sendo alguns sinais desvalorizados ou alguns estudos terem registado apenas os sinais clínicos no dia da admissão, enquanto que no presente estudo, para além destes, também foram registados os sinais durante todo o período de internamento do animal.

Relativamente à temperatura rectal, a média foi de $38,0 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$, a mediana 38°C , a temperatura mínima registada foi de 35°C e a máxima $40,6^{\circ}\text{C}$, sendo semelhantes ao descrito em estudos recentes, onde se verificou uma média de $38,3 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$, uma mediana de $37,8^{\circ}\text{C}$, um mínimo de $36,8^{\circ}\text{C}$ e um máximo de $39,8^{\circ}\text{C}$ (Adin and Cowgill 2000; Sonet et al. 2017). Para a frequência cardíaca, a média foi de 128,6 bpm, a mediana 120 bpm, o mínimo foi de 68 bpm e o máximo 244 bpm. Sonet et al. (2017) reportam os seguintes valores: mediana de 90 bpm, valor mínimo de 60 bpm e valor máximo de 200 bpm.

Em relação à frequência respiratória, a média foi de 34,4 rpm, a mediana 28 rpm, a frequência respiratória mínima foi de 14 rpm e a máxima de 92 rpm, estando descrito por Sonet et al. (2017), uma mediana de 30 rpm, um valor mínimo de 20 rpm e um máximo de 60 rpm.

5.5 Hemograma

As principais alterações verificadas no hemograma foram as seguintes: a leucocitose (66,0%), a neutrofilia (68,0% e com desvio à esquerda em 38,5%), a eosinopenia (52,2%), a monocitose (41,7%), a anemia (38,9%), a trombocitopenia (37,7%) e a linfopenia (23,9%). Estes resultados são concordantes com os obtidos por estudos recentes, no caso da leucocitose, que se encontra descrita com frequências entre os 57% e os 81%, da neutrofilia entre os 65% e os 88% (com desvio à esquerda entre os 25% e os 37%), da trombocitopenia entre os 28% e os 63%, e da monocitose entre os 29% e os 72%. No caso da anemia e da linfopenia, as frequências obtidas foram ligeiramente inferiores às descritas por outros Autores, com frequências respetivamente, entre os 40% e os 78% para a anemia, e entre os 30% e 75% para a linfopenia (Branger et al. 2005; Geisen et al. 2007; Kohn et al. 2010; Sykes 2014; Duarte 2015; Knöpfler et al. 2017).

Segundo Greene et al. (2012) a trombocitopenia, é o achado mais frequente nas alterações do hemograma de cães com leptospirose. No presente estudo 64,2% dos cães tinham trombocitopenia e 26,4% apresentavam agregação plaquetária, sendo por isso difícil saber qual a verdadeira frequência de trombocitopenia na população investigada.

A eosinopenia apresentou uma frequência muito superior, comparativamente com a descrita na bibliografia consultada, apresentando uma frequência de 52,2% e de 0% respetivamente (Sykes 2014). A eosinopenia pode ser devido ao facto de a leptospirose causar uma infeção aguda ou devida ao stress (Gough and Murphy 2015).

Com uma frequência muito menor verificaram-se ainda as seguintes alterações no hemograma: neutropenia (6,0%); trombocitose (5,7%); linfocitose (4,4%); eritrocitose (4,0%); leucopenia (3,8%); eosinofilia (2,2%). Estes resultados estão de acordo com outros estudos publicados, visto que estas alterações no hemograma também se encontram em menor frequência (Kohn et al. 2010; Sykes 2014; Duarte 2015; Knöpfler et al. 2017).

5.6 Bioquímicas e ionograma

As principais alterações verificadas nas análises bioquímicas foram as seguintes. Dos 9 cães que realizaram a AST, todos (100%) apresentavam um valor aumentado relativamente ao intervalo de referência, 81,8% dos cães apresentavam hiperbilirrubinemia, 70,6% apresentaram um aumento da ureia, 69,2% um aumento da creatinina, 55,1% um aumento da ALT, 40,9% um aumento da FAS e por fim, 19,1% tinham hipoalbuminemia.

Relativamente ao descrito noutros estudos recentes, recolhemos as seguintes frequências: um aumento da AST em 63% dos casos; hiperbilirrubinemia entre os 32% e os 83%; aumento da ureia entre os 84% e os 98%; aumento da creatinina entre os 81 e os 100%; aumento da ALT entre os 48% e os 78%; aumento da FAS entre os 33% e os 90% e da hipoalbuminemia entre os 12% e os 96% (Geisen et al. 2007; Kohn et al. 2010; Sykes 2014; Duarte 2015; Knöpfler et al. 2017). As frequências do aumento da AST e da bilirrubina total, devem ser analisadas com prudência visto que foram medidas em poucos animais (respetivamente em 9 e em 11 cães).

No caso da ureia e da creatinina, verificou-se uma menor frequência relativamente ao descrito em outros estudos. Nos restantes parâmetros das análises bioquímicas, as frequências do aumento da ALT, do aumento da FAS e da hipoalbuminemia, encontram-se dentro do esperado. Com uma menor frequência, verificou-se a ocorrência de hiperproteinemia (8,6%) que pode ser devida a desidratação.

Quanto ao ionograma, as alterações mais frequentes foram: hipocloremia (63,2%); hiponatremia (52,6%); hiperfosfatemia (25,0%) e a hipocaliemia (19,4%). Outros estudos reportaram as seguintes frequências: 73% para a hipocloremia; entre os 33% e os 75% para a hiponatremia; 67% a 91% para a hiperfosfatemia; 29% a 35% para a hipocaliemia (Geisen et al. 2007; Kohn et al. 2010; Duarte 2015; Knöpfler et al. 2017).

As frequências verificadas para a hipocloremia e hipocaliemia, estão ligeiramente inferiores ao descrito em outros estudos, e no caso da hiponatremia está de acordo com o publicado. Menos frequentemente verificou-se a hipercalemia (6,5%), estando descrita uma frequência entre os 18% e os 20% (Sykes 2014; Duarte 2015).

5.7. Urianálise

Dos 55 cães positivos, em apenas 19 foi realizada a urianálise, e as principais alterações observadas foram a proteinúria (94,7%), a hematúria (73,7%), a glicosúria (36,8%), a bilirrubinúria (31,6%), a piúria (26,3%) e a isostenúria (15,8%). Com uma menor frequência, verificou-se a presença de cilindrúria (10,5%) e hipostenúria (5,4%).

Em publicações recentes, as principais alterações reportadas na urianálise foram: proteinúria entre os 71% e os 83%; hematúria microscópica entre os 17% e os 85%; glicosúria entre os 26 e os 83%; piúria entre os 27% e os 58%; isostenúria com 83% e cilindrúria com

34,3% (Birnbaum et al. 1998; Adin and Cowgill 2000; Geisen et al. 2007; Kohn et al. 2010; Sykes 2014; Knöpfler et al. 2017).

O rácio UPC apenas foi realizado em 2 cães, não sendo por isso possível tirar conclusões, mas ambos os animais estavam proteinúricos. Em outros estudos, o aumento do rácio UPC está descrito em cães com leptospirose, com uma frequência entre os 78% e os 94% (Kohn et al. 2010; Knöpfler et al. 2017).

5.8. Imagiologia

Dos 36 cães positivos a leptospirose que realizaram ecografia abdominal, verificou-se que apresentavam uma maior frequência de alterações hepáticas e/ou da vesícula biliar (63,9%), relativamente às alterações renais (44,4%). As principais alterações apresentadas na ecografia abdominal foram a hepatomegália (47,2%), a hipoecogenecidade hepática (38,9%), as lamas biliares (22,2%), a hiperecogenecidade do córtex renal (25,0%), a esplenomegalia (25,0%), a linfadenomegália (19,4%) e a perda da transição cortico-medular (16,7%). O *medullary rim sign* e a renomegália apenas se verificaram em 5,6% dos cães.

Na bibliografia consultada, estão descritas as seguintes alterações ecográficas, com as suas respetivas frequências, em cães diagnosticados com leptospirose: alterações renais entre os 83% e os 85,7%; renomegália em 42,9%; aumento da ecogenecidade do córtex renal em 28,8%; pielectasia em 9,5%; acumulação de fluido perirenal entre os 14,3% e os 19,0%; hiperecogenecidade renal difusa em 14,3%; ascite em 46,0% e a *medullary rim sign* em 23,8% (Sykes 2014; Duarte 2015; Sonet et al. 2017).

Ocasionalmente, podem estar presentes alterações no pâncreas (9%), com sinais de pancreatite (com um aumento do pâncreas em 6% e com hipoecogenecidade em 9%), o espessamento da parede gástrica em 26% e da parede intestinal em 49% dos cães.

As alterações hepáticas estavam também presentes, entre os 71,4% e os 83,0%, com a hepatomegália entre os 47,6% e os 60,0%, e a hipoecogenecidade hepática entre os 23,8% e os 71,0%. Está também descrita a ocorrência de esplenomegália, entre os 20% e os 33,3% e de linfadenomegalia abdominal entre os 23,8% e os 38,0% (Sykes 2014; Duarte 2015; Sonet et al. 2017).

Na vesícula biliar, estão descritas alterações em 60% dos casos: 46% com lamas biliares, 29% com um espessamento da parede da vesícula biliar, 26% com mucocelo e 20% com uma hiperecogenecidade da parede (Sonet et al. 2017). Nenhuma destas alterações ecográficas é específica de leptospirose (Sykes 2014).

A maioria das alterações descritas anteriormente, foram também observadas neste estudo, mas verificou-se uma menor frequência de alterações renais, o que pode ser explicado pelo surgimento de novos serogrupos infetantes para cães, em particular na Europa

(Major et al. 2014). Contudo, num estudo realizado por Sonet et al. (2017), não se evidenciou uma associação entre os serovares infetantes e as alterações ecográficas.

Knöpfler et al. (2017) descreveram as seguintes alterações na ecografia de cães com leptospirose: 53% tinham alterações no fígado e/ou vesícula biliar; 31% no baço e 14% no rim. Apresentam por isso, uma frequência menor de alterações renais, comparativamente com as do fígado e/ou vesícula biliar tal como no presente estudo.

Ao contrário do que foi descrito por Sonet et al. (2017), em que a presença de um mucocelo na vesícula biliar era um sinal de aviso de leptospirose em cães, com uma frequência de 26%, no presente estudo apenas se observou num caso.

Estes resultados, reforçam a importância de realizar ecografia abdominal em cães diagnosticados com leptospirose, de forma a avaliar os danos, visto que se trata de uma doença multissistémica, que provoca lesões em vários órgãos.

Dos 18 cães que realizaram radiografia torácica, apenas 8 apresentaram alterações, sendo as mais frequentes o padrão intersticial não estruturado (27,8%) e o padrão interstício-alveolar (11,1%). Doze dos cães que realizaram radiografia torácica, apresentavam sinais clínicos de alterações respiratórias, dos quais 7 tinham a auscultação pulmonar alterada, 5 tosse e 4 dispneia. Apenas dois cães com alterações na radiografia torácica tinham dispneia, sendo que, um deles apresentava um padrão intersticial retículo-nodular associado a um padrão interstício-alveolar e o outro um padrão vascular.

Não se evidenciou uma associação entre a presença de sinais clínicos respiratórios e as alterações pulmonares radiológicas, como descreveram Kohn et al. (2010), em que sete cães tinham alterações na radiografia torácica sem dispneia e seis cães dispneicos não tinham alterações na radiografia torácica. A dispneia pode dever-se a outras causas, tais como a dor ou acidose.

Frequentemente, em cães com leptospirose, verifica-se a presença de um padrão intersticial ligeiro a moderado (Birnbau et al. 1998; Mastroilli et al. 2007; Kohn et al. 2010), e com uma menor frequência pode verificar-se a presença de um padrão intersticial nodular ou difuso grave e padrões alveolares, em cães com a Síndrome Pulmonar Hemorrágica Leptospiral (Baumann 2001; Klopfleisch et al. 2010; Sykes 2014). Estas alterações, são concordantes com o observado neste estudo.

O padrão intersticial retículo-nodular, está associado a hemorragias pulmonares, provavelmente devido a danos no endotélio e a vasculite. Para este tipo de padrão pulmonar, existem vários diagnósticos diferenciais, tais como as neoplasias, a pneumonia, o edema, as hemorragias devido a CID e o tromboembolismo, por isso em cães com insuficiência renal aguda e com este tipo de padrão, deve-se considerar sempre a possibilidade de hemorragia pulmonar aguda, como manifestação de uma infeção por leptospirose (Baumann 2001).

5.9. Duração do internamento

A mediana de dias de internamento, para os cães sobreviventes foi de 6 dias, enquanto que para os não sobreviventes foi de 3 dias. A diferença de 3 dias é significativa. A maioria das mortes e eutanásias, ocorreram entre o 1º e 4º dia de internamento.

É normal que os cães sobreviventes, necessitem de um maior tempo até terem alta clínica, pois só é possível administrar a doxiciclina se estiverem a alimentar-se, sem vômito nem diarreia, e é necessário que realizem o tratamento com a doxiciclina, durante pelo menos 48 horas, para eliminar a leptospirúria, de forma a ser seguro dar alta, porque para além de poderem transmitir a infeção a outros cães através da urina, a leptospirose é uma zoonose e um problema de Saúde Pública (Truccolo et al. 2002). Na UICB, os cães positivos a leptospirose, que não realizem as 48 horas de tratamento com a doxiciclina em ambiente hospitalar, têm alta contraindicada, mesmo que o cão esteja estável, e os detentores têm de assinar um termo de responsabilidade, em como têm conhecimento dos riscos inerentes.

Está também descrito que a normalização na contagem das plaquetas, na concentração sérica da ureia e da creatinina, e na atividade das enzimas hepáticas, leva 10 a 14 dias, quando o tratamento tem sucesso (Sykes et al. 2011). Contudo, no presente estudo, apenas se verificou uma associação significativa, entre a presença de neutrofilia e o tempo para a ocorrência de alta clínica, não se verificando que os parâmetros referidos anteriormente, afetassem a probabilidade de alta, num dia específico do internamento, de forma significativa.

5.10 Terapêutica

Verificou-se neste estudo, que os antibióticos mais utilizados foram a ampicilina (69,1%), a doxiciclina (65,5%) e a amoxicilina com ácido clavulânico (30,9%). Em 29 (52,7%) cães foi utilizada uma associação de ampicilina e doxiciclina, e em 10 (18,2%) de amoxicilina e ácido clavulânico com a doxiciclina, o que está de acordo com o recomendado pelo *Consensus Statements*, do ACVIM (*American College of Veterinary Internal Medicine*), e pelo *European consensus statement on leptospiroses* do BSAVA (*British Small Animal Veterinary Association*), que recomendam o uso de doxiciclina, se a administração oral for possível (quando os cães já se alimentam e na ausência de vômito e diarreia), de forma a eliminar a leptospiremia e as leptospiras dos túbulos renais. Quando a administração oral não é possível, está recomendado o uso de ampicilina ou amoxicilina com ácido clavulânico, por via intravenosa, e assim que a administração oral de doxiciclina seja possível, deverá ser iniciada, visto que a ampicilina e a amoxicilina apesar de eliminarem a leptospiremia, não atuam nos túbulos renais, continuando a haver excreção de leptospiras na urina (Truccolo et al. 2002; Sykes et al. 2011; Schuller et al. 2015).

Em relação ao tratamento, a utilização de doxiciclina ($p<0,01$) e de ampicilina ($p=0,007$), traduziram-se numa maior sobrevivência. Os cães que realizaram o tratamento com a ampicilina, apresentaram uma probabilidade 0,18 vezes menor de morrer relativamente aos restantes ($p=0,01$), enquanto que com a doxiciclina esta probabilidade foi de 0,02 ($p=0,0003$).

Quando os cães são suspeitos de leptospirose, está recomendado começar logo a antibióterapia antes de se ter o diagnóstico definitivo, porque assim a recuperação clínica vai ser maior e como na fase inicial, na maioria dos casos, os cães não toleram a doxiciclina, o facto de se administrar a ampicilina, que vai eliminar a leptospiremia, conduz a um melhor desfecho (Truccolo et al. 2002; Sykes et al. 2011; Sykes 2014; Schuller et al. 2015).

Os cães que fizeram tratamento com furosemida, apresentaram uma probabilidade 9,5 vezes superior de morte, relativamente aos que não fizeram este tratamento ($p=0,043$). A furosemida é um diurético, que é utilizado em situações de oligúria ou anúria, de forma a evitar uma sobrecarga de fluidos, e a aumentar a produção urinária, mas aquando do seu uso, os cães já se encontram por vezes em estado crítico, estando por isso o uso deste fármaco associado a uma maior mortalidade.

Adin and Cowgill (2000) descreveram uma taxa de recuperação superior a 80%, em cães que fizeram hemodiálise, que apresentavam uma azotemia grave e não estavam a responder ao manejo médico. No nosso estudo, nenhum cão fez hemodiálise, por isso não é possível avaliar se afetaria ou não a sobrevivência, nos casos de insuficiência renal grave.

Apesar de existirem poucos estudos que comprovem a eficácia da metilprednisolona, em cães com a Síndrome de Hemorragia Pulmonar Leptospiral, está aconselhado o seu uso (Greene et al. 2012; Sykes 2014). No presente estudo, 8 cães fizeram corticoterapia, contudo apenas 2 apresentavam alterações respiratórias, e não apresentaram melhorias com a administração dos corticosteroides, sendo que um deles foi submetido a eutanásia e o outro morreu. Não é possível tirar conclusões quanto à eficácia dos corticosteroides em animais com sintomatologia respiratória grave, visto que o número de cães que fez este tratamento foi muito reduzido. O mesmo se passou relativamente aos protetores hepáticos, administrados apenas em dois cães.

A taxa de sobrevivência neste estudo foi de 50,9%, superior à descrita recentemente noutra estudo realizado em Portugal, com uma taxa de 43,0% (Duarte 2015). Relativamente a outros estudos realizados na Europa, verificou-se que a taxa de sobrevivência variou entre os 52% e os 68%, o que não difere muito da obtida (Geisen et al. 2007; Kohn et al. 2010; Major et al. 2014; Knöpfler et al. 2017).

Num estudo realizado na Califórnia, 83% dos cães sobreviveram, incluindo 86% dos cães tratados com hemodiálise (cães com azotemia grave) e 82% dos tratados de forma conservativa (cães com azotemia ligeira a moderada), verificando-se uma taxa bastante

superior à obtida neste estudo, o que pode dever-se à realização de hemodiálise nos casos mais graves de azotemia (Adin and Cowgill 2000).

No presente estudo, nenhum animal realizou hemodiálise, o que pode explicar a taxa de sobrevivência atingida. Em Portugal, são poucos os locais onde é possível realizar hemodiálise em animais, e os custos são bastante elevados, o que leva a que seja um tratamento muito pouco utilizado.

Outras possíveis razões, para as diferenças na taxa de sobrevivência, são o facto de existirem estirpes com patogenicidade diferente e também por depender da capacidade financeira dos detentores em poderem ou não pagar a hospitalização e o tratamento.

6. Conclusões

Considerando que a leptospirose é uma zoonose, e que não é uma doença de declaração obrigatória em Medicina Veterinária, é fundamental caracterizar a epidemiologia da doença, principalmente porque são poucos os estudos recentes publicados em Portugal. Neste estudo retrospectivo, apuraram-se os fatores de risco, os indicadores de prognóstico, as principais alterações clínicas, analíticas, e imagiológicas e qual a melhor terapêutica a ser aplicada, a partir dos registos das fichas clínicas de cães internados na UICB do HE, positivos para leptospirose.

A maioria dos cães, foram diagnosticados a partir da serologia IgM, e em nenhum caso foi realizado o MAT, não sendo por isso possível aferir quais os serovares infetantes, nem a sua prevalência.

Relativamente aos fatores de risco, concluiu-se que o género, o facto de os cães machos se encontrarem castrados, a raça, o número de animais coabitantes, o estilo de vida, e o estatuto vacinal, não influenciaram a ocorrência de leptospirose. A idade foi identificada como um fator de risco, sendo que, os cães adultos (entre os 2 e os 7 anos) foram os mais afetados, e os pertencentes ao escalão sénior (com idade ≥ 8 anos), apresentaram uma menor frequência, com uma probabilidade 0,34 vezes menor de contrair a doença relativamente aos cães adultos.

A esterilização das cadelas revelou-se um fator protetor, visto que apresentaram uma menor frequência da doença e uma probabilidade de morte 0,26 vezes inferior às fêmeas inteiras.

A frequência de hospitalizações foi superior no inverno e relativamente semelhante no outono e na primavera, o que é concordante com as estações de maior pluviosidade, e no verão, o risco de contrair a doença foi 0,25 vezes menor do que no inverno.

Em relação aos indicadores de prognóstico, concluiu-se que, o género, o porte, a raça e o tipo de consulta não afetaram de forma significativa o desfecho clínico, ao contrário da idade, com os cães do escalão sénior (idade ≥ 8 anos), a apresentaram maior taxa de mortalidade.

Os sinais clínicos mais frequentes foram o vômito (72,7%), a anorexia (50,9%), a diarreia (40,0%) e a hematuria (40,0%). Dos sinais clínicos apresentados, apenas a oligoanúria e a hipotermia afetaram o desfecho clínico de forma significativa, sendo que os cães com hipotermia, apresentaram uma probabilidade de morte 5,7 vezes maior do que os restantes cães.

Concluiu-se que, a maioria dos cães positivos a leptospirose, apresentavam leucocitose com neutrofilia (68,0%), trombocitopenia (51,3%), aumento da ALT (55,1%), aumento da AST (100%), aumento da bilirrubina total (81,8%) e aumento da ureia (70,6%) e

da creatinina (69,2%), logo mais de metade dos cães investigados tinham concomitantemente alterações renais e hepáticas.

Dos cães que realizaram hemograma e ionograma, verificou-se que nenhuma alteração influenciou significativamente o desfecho clínico da doença, nem mesmo a trombocitopenia e a neutrofilia, como descrito em outros estudos. Relativamente às análises bioquímicas, apenas o aumento da creatinina e da ureia afetou o desfecho de forma significativa, verificando-se uma diminuição da taxa de sobrevivência nestes casos. Os cães com a creatinina aumentada, apresentaram uma probabilidade de morte 4,7 vezes superior à dos outros cães infetados.

Dos cães que realizaram a urianálise, a grande maioria apresentava proteinúria (94,7%) e hematúria (73,7%), mas nenhuma das alterações influenciou o desfecho.

Apesar de nenhuma alteração ecográfica ser específica de leptospirose, concluiu-se que as principais alterações na ecografia abdominal, neste estudo foram a hepatomegália (47,2%), a hipoecogenicidade hepática (38,9%), a hiperecogenicidade do córtex renal (25,0%), a esplenomegália (25,0%), as lamas biliares (22,2%) e a perda da transição cortico-medular (16,7%). As alterações respiratórias e da radiografia torácica, não influenciaram a mortalidade, ao contrário do reportado noutros estudos.

Concluiu-se também que, houve uma concordância de utilização dos antibióticos recomendados, sendo que a maioria dos cães foi medicada com ampicilina (69,1%) e doxiciclina (65,5%).

Apenas a neutrofilia afetou significativamente o tempo de hospitalização. A média dos dias de hospitalização foi de 4,9 dias, com uma diferença significativa na mediana, entre os cães sobreviventes e os não sobreviventes de 3 dias.

A taxa de sobrevivência neste estudo foi de 50,9%, semelhante às descritas em outros estudos realizados na Europa.

As principais limitações deste estudo, foram essencialmente a sua natureza retrospectiva. Os dados dos sinais clínicos, estatuto vacinal, tipo de vacina utilizada e tratamento implementado, nem sempre se encontravam registados nas fichas clínicas, condicionando as conclusões. As análises laboratoriais e os exames imagiológicos, não foram realizados em todos os casos, por razões de incapacidade económica dos detentores, o que também impediu uma avaliação mais detalhada.

Consideraram-se positivos à leptospirose, a maioria dos cães onde apenas foi realizada a serologia IgG e IgM, e apesar de apresentarem sinais clínicos, laboratoriais e imagiológicos compatíveis com o quadro de leptospirose, teria sido mais correto realizar um PCR ou um MAT para confirmar o diagnóstico. Teria sido muito frutuoso realizar o MAT, de forma a saber quais os serogrupos e serovares que mais frequentemente afetam os cães em Portugal, e se as vacinas disponíveis no mercado são eficazes e qual a mais adequada. No

presente estudo, tendo em conta que o estatuto vacinal, e o tipo de vacina utilizada, não se encontravam registados na maioria dos casos, não foi possível tirar conclusões.

7. Referências Bibliográficas

- Adin CA, Cowgill LD. 2000. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). *J Am Vet Med Assoc.* 216(3):371–375.
- Adler B, Klaasen E. 2015. Recent advances in canine leptospirosis: focus on vaccine development. *Vet Med Res Reports.* 6:245–260.
- André-Fontaine G. 2006. Canine leptospirosis — Do we have a problem? *Vet Microbiol.* 117(1):19–24.
- Andre G, Branger C, Gray AW, Klaasen HLBM. 2003. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet Rec.* 153(6):165–169.
- Arbour J, Blais M, Carioto L, Sylvestre D. 2012. Clinical Leptospirosis in Three Cats (2001 – 2009). *J Am Anim Hosp Assoc.* 48(12):256–260.
- Barbosa AS, Abreu PAE, Vasconcellos SA, Morais ZM, Gonc AP, Silva AS, Daha MR, Isaac L. 2009. Immune Evasion of *Leptospira* Species by Acquisition of Human Complement Regulator C4BP. *77(3):1137–1143.*
- Barmettler R, Schweighauser A, Bigler S, Grooters AM, Francey T. 2011. Assessment of exposure to *Leptospira* serovars in veterinary staff and dog owners in contact with infected dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 238(2):183–188.
- Barr SC, Mcdonough PL, Scipioni-ball RL, Starr JK. 2005. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar pomona and *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. *Am J Vet Res.* 66(10):1780–1784.
- Baumann D. 2001. Radiographic Findings in the Thorax of Dogs with Leptospiral Infection. *Vet Radiol Ultrasound.* 42(4):305–307.
- Bernheimerl AW, Bey RF. 1986. Copurification of *Leptospira interrogans* Serovar pomona Hemolysin and Sphingomyelinase C. *Infect Immun.* 54(1):262–264.
- Bharti, Nally, Ricaldi, Matthias, Diaz, Lovett, Levett, Gilman, Willing, Gotuzzo, et al. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *3(12):757–771.*
- Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, Simpson KW. 1998. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: Serological and clinicopathological features. *J Small Anim Pract.* 39(5):231–236.
- Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, André-Fontaine G. 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett.* 243(2):437–445.
- Brod C, Aleixo G, Jouglard S, Fernandes C, Teixeira J, Dellagostin O. 2005. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana : isolamento de um sorovar , caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis : a serovar isolation , molecular characterization. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38(4):294–300.
- Bruchim Y, Aroch I, Saragusty J, Waner T. 2008. Disseminated intravascular coagulation. *Compendium.* 30(10):E1–E16.

- Chen Y, Cheng S, Wang H, Yang P. 2007. Successful Treatment of Pulmonary Hemorrhage Associated with Leptospirosis and Scrub Typhus Coinfection by Early Plasma Exchange. *J Formos Med Assoc.* 106(2):S1–S6.
- Cruz JPG. 2016. Estudo Retrospectivo de Leptospirose na Região do Baixo Vouga entre 2011 e 2015. Escola Universitária Vasco da Gama.
- Curtis K, Foster P, Smith P, Monn M, Stillman B, Chandrashekar R, Lappin M, Goldstein R. 2015. Performance of a Recombinant LipL32 Based Rapid In-clinic ELISA (SNAP® Lepto) for the Detection of Antibodies Against Leptospira in Dogs. *International J Appl Res Vet Med.* 13(3):182–189.
- Davenport A, Rugman FP, Desmond MJ, Ganta R. 1989. Is thrombocytopenia seen in patients with leptospirosis immunologically mediated? *J Clin Pathol.* 42(4):439–440.
- Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD, Squires RA. 2016. Diretrizes para a vacinação de cães e gatos compiladas pelo Grupo de Diretrizes de Vacinação (VGG) da Associação Veterinária Mundial de Pequenos Animais (WSAVA). *J Small Anim Pract.* 57(1):1–50.
- Deliberação nº 607/2015- Diário da República. 2ª série nº. 79, 23 de Abril de 2015.
- Dey S, Mohan CM, Kumar TMAS, Ramadass P, Nainar AM, Nachimuthu K. 2004. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Vet Microbiol.* 103(1–2):99–106.
- DGAV. 2015. Lista das doenças de declaração obrigatória a nível nacional. :1–3.
- Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CRR. 2007. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Brazilian J Infect Dis.* 11(1):142–148.
- Duarte RBV da S. 2015. Contributo para o estudo da Leptospirose canina na grande área metropolitana de Lisboa. *Univ Lisboa Fac Med Veterinária.(III):*47–59.
- Ellis WA. 1986. Leptospirosis. *J Small Anim Pract.* 27(10):683–692.
- Ellis WA. 2010. Control of canine leptospirosis in Europe: Time for a change? *Vet Rec.* 167(16):602–605.
- Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E. 2017. Leptospirosis. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat.* 8th ed. St. Louis (MO): Elsevier. p. 2335–2346.
- Fraune C, Schweighauser A, Francey T. 2013. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J Am Vet Med Assoc.* 242(10):1373–1380.
- Gaspar C, Augusto G, Albuquerque M, Nascimento M, Vicêncio P, Nogueira P. 2017. 4.33. Leptospirose. In: *Doenças de declaração obrigatória 2013-2016. Vol. I. Volume I.* Lisboa: Direção-Geral da Saúde. p. 57–58.
- Gautam R, Wu C, Guptill L, Potter A, Moore GE. 2010. Detection of antibodies against Leptospira serovars via microscopic agglutination tests in dogs in the United States, 2000-2007. *J Am Vet Med Assoc.* 237(3):293–298.

- Geisen V, Stengel C, Brem S, Muller W, Greene C, Hartmann K. 2007. Canine Leptospirosis Infections – Clinical Signs and Outcome With Different Suspected *Leptospira* Serogroups (42 Cases). *J Small Anim Pract.* 48(6):324–328.
- Gendron K, Christe A, Walter S, Schweighauser A, Francey T, Doherr MG, Lang J. 2014. Serial CT features of pulmonary leptospirosis in 10 dogs. *Vet Rec.* 174(7).
- Gilad J, Borer A. 2000. Treatment of Acute Lung Injury Attributed to Leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 31(3):844.
- Goldstein RE. 2010. Canine Leptospirosis. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 40(6):1091–1101.
- Goldstein RE, Lin RC, Langston CE, Scrivani P V., Erb HN, Barr SC. 2006. Influence of Infecting Serogroup on Clinical Features of Leptospirosis in Dogs. *J Vet Intern Med.* 20(3):489–494.
- Gough A, Murphy K. 2015. *Differential Diagnosis in Small Animal Medicine.* 2nd ed. Oxford: WILEY Blackwell.
- Greene, Sykes, Moore, Goldstein, Schultz. 2012. Leptospirosis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th ed. St. Louis (MO): Elsevier. p. 431–447.
- Greenlee JJ, Alt DP, Bolin CA, Zuerner RL, Andreasen CB. 2005. Experimental canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars pomona and bratislava. 66(10):1816–1822.
- Grosenbaugh DA, Pardo MC. 2018. Fifteen-month duration of immunity for the serovar Grippotyphosa fraction of a tetravalent canine leptospirosis vaccine. *Vet Rec.* 182(23):665–670.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 68(4):2276–2285.
- Hartmann K, Egberink H, Pennisi MG, Lloret A, Addie D, Belák S, Frymus T, Gruffydd-jones T, Hosie MJ, Lutz H, et al. 2013. *Leptospira* Species Infection in Cats ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 15(7):576–581.
- Jancloes M, Bertherat E, Schneider C, Belmain S, Munoz-Zanzi C, Hartskeerl R, Costa F, Denis J, Benschop J. 2014. Towards a “ One Health ” Strategy against Leptospirosis. *GRF Davos Planet@Risk.* 2(3):204–206.
- Juvel F, Schuller S, Neill EJO, Neill PAO, Nally JE. 2011. Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. *Vet Rec.* 168(21):28–30.
- Klaasen HLB, Molkenboer MJCH, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ. 2003. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet Microbiol.* 95(1–2):121–132.
- Klopfleisch R, Kohn B, Plog S, Weingart C. 2010. Case Report An Emerging Pulmonary Haemorrhagic Syndrome in Dogs: Similar to the Human Leptospiral Pulmonary Haemorrhagic Syndrome ? *Vet Med Int.* 2010:1–7.
- Knöpfler S, Mayer-Scholl A, Luge E, Klopfleisch R, Gruber AD, Nöckler K, Kohn B. 2017.

- Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *J Small Anim Pract.* 58(10):528–588.
- Kodjo A, Calleja C, Loenser M, Lin D, Lizer J. 2016. A Rapid In-Clinic Test Detects Acute Leptospirosis in Dogs with High Sensitivity and Specificity. *Biomed Res Int.* 2016(1):1–3.
- Kohn B, Steinicke K, Arndt G, Gruber AD, Guerra B, Jansen A, Kaser-Hotz B, Klopfleisch R, Lotz F, Luge E, et al. 2010. Pulmonary Abnormalities in Dogs with Leptospirosis. *J Vet Intern Med.* 24(6):1277–1282.
- Kularatne SAM, Budagoda BDSS, Alwis VKD De, Wickramasinghe WMRS, Bandara JMRP, Pathirage LPMMK, Gamlath GRRDK, Wijethunga TJ, Jayalath WATA, Jayasinghe C, et al. 2011. High efficacy of bolus methylprednisolone in severe leptospirosis: a descriptive study in Sri Lanka. *Postgrad Med J.* 87(1023):13–17.
- Lança SIO. 2011. Contribuição para o estudo da leptospirose canina em portugal. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Lee SH, Kim S, Park SC, Kim Min Ja, Kim KA, Kim YK, Seong IW, Kim M J, Lee YJ, Al LEEET, et al. 2002. Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* Hemolysin SphH as a Pore-Forming Protein on Mammalian Cells. *Infect Immun.* 70(1):315–322.
- Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 14(2):296–326.
- Lizer J, Grahlmann M, Hapke H, Velineni S, Lin D, Kohn B. 2017. Evaluation of a rapid IgM detection test for diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Vet Rec.* 180(21):1–5.
- Loss SR, Marra PP. 2017. Population impacts of free- ranging domestic cats on mainland vertebrates. *Ecol Soc Am.* 15(9):502–509. doi:10.1002/fee.1633.
- Major A, Schweighauser A, Francey T. 2014. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *Int J Environ Res Public Health.* 11(7):7242–7260.
- Martin LER, Wiggans KT, Wennogle SA, Curtis K, Chandrashekar R, Lappin MR. 2014. Vaccine-Associated *Leptospira* Antibodies in Client-Owned Dogs *Leptospira* Vaccine Responses in Dogs Martin et al. *J Vet Intern Med.* 28(3):789–792.
- Martins MG, Matos KTF, Da Silva M V., De Abreu MT. 1998. Ocular manifestations in the acute phase of leptospirosis. *Ocul Immunol Inflamm.* 6(2):75–79.
- Mastorilli C, Dondi F, Agnoli C, Turba ME, Vezzali E, Gentilini F. 2007. Clinicopathologic Features and Outcome Predictors of *Leptospira interrogans* Australis Serogroup Infection in Dogs: A Retrospective Study of 20 Cases (2001–2004). (21):3–10.
- Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. 2005. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microb Pathog.* 39(4):139–147.
- Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM, Goldstein RE. 2012. Effects of Recent *Leptospira* Vaccination on Whole Blood Real-Time PCR Testing in Healthy Client-Owned Dogs. *J Vet Intern Med.* 26(1):149–152.
- Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Lunn KF. 2011. Variability in Results of the Microscopic Agglutination Test in Dogs with Clinical Leptospirosis and Dogs Vaccinated against Leptospirosis. *J Vet Intern Med.* 25(3):426–432.

- Minke JM, Bey R, Tronel JP, Latour S, Colombet G, Yvarel J, Cariou C, Guiot AL, Cozette V, Guigal PM. 2009. Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Vet Microbiol.* 137(1–2):137–145.
- Moore GE, Guptill LF, Ward MP, Glickman NW, Faunt KK, Lewis HB, Glickman LT. 2005. Adverse events diagnosed within three days of vaccine administration in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 227(7):1102–1108.
- Parsons MH, Banks PB, Deutsch MA, Munshi-south J. 2018. Temporal and Space-Use Changes by Rats in Response to Predation by Feral Cats in an Urban Ecosystem. 6(September):1–8. doi:10.3389/fevo.2018.00146.
- Ramsey I, editor. 2014. BSAVA Small Animal Formulary. 8th ed. Gloucester (UK): British Small Animal Veterinary Association.
- Reagan KL, Sykes JE. 2019. Diagnosis of Canine Leptospirosis. *Vet Clin NA Small Anim Pract.* 49(4):1–13.
- Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH. 1992. Canine Leptospirosis A Retrospective Study of 17 Cases. *J Vet Intern Med.* 6(4):235–244.
- Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. 2010. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: A maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29(10):1305–1309.
- Scanziani E, F. Origgi, Giusti AM, Iacchia G, Vasino A, Pirovano G, Scarpa P, Tagliabue S. 2002. Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy. *J Small Anim Pract.* 43(4):154–157.
- Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. 2015. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 56(3):159–179.
- Schweighauser A, Burgener IA, Gaschen F, Luckschander N, Hasler A, Lang J, Francey T. 2009. Small intestinal intussusception in five dogs with acute renal failure and suspected leptospirosis (*L . australis*). 19(4):363–368.
- Silva JM da, Prata S, Domingues TD, Leal RO, Nunes T, Tavares L, Almeida V, Sepúlveda N, Gil S. 2020. Detection and modeling of anti-Leptospira IgG prevalence in cats from Lisbon area and its correlation to retroviral infections, lifestyle, clinical and hematologic changes. *Vet Anim Sci.* 10(May):1–7.
- Sonet J, Barthélemy A, Goy-thollot I, Pouzot-nevoret C. 2017. Prospective evaluation of abdominal ultrasonographic findings in 35 dogs with leptospirosis. *Vet Radiol Ultrasound.* 59(1):1–9.
- Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G. 2000. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine.* 19(1):86–94.
- Stokes JE, Kaneene JB, Schall WD, Kruger JM, Miller R, Kaiser L, Bolin CA. 2007. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 230(11):1657–1664.

- Sykes JE. 2014. Leptospirosis. In: Canine and Feline Infectious Diseases. 1st ed. St. Louis (USA): Elsevier. p. 474–486.
- Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2011. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J Vet Intern Med.* 25(1):1–13.
- Thompson JC, Manktelow BW. 1986. Pathogenesis and red blood cell destruction in haemoglobinaemic leptospirosis. *J Comp Pathol.* 96:529–540.
- Timoney JF, Kalimuthusamy N, Velineni S, Donahue JM, Artiushin SC, Fetting M. 2011. A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. *Vet Microbiol.* 150(3–4):349–353.
- Townsend WM, Stiles J, Krohne SG, Townsend WM. 2006. Leptospirosis and panuveitis in a dog. *Vet Ophthalmol.* 9(3):169–173.
- Trivedi S V, Vasava AH, Patel TC, Bhatia LC. 2009. Cyclophosphamide in pulmonary alveolar hemorrhage due to leptospirosis. *Indian J Crit care Med.* 13(2):79–84.
- Troia R, Balboni A, Zamagni S, Frigo S, Magna L, Perissinotto L, Battilani M, Dondi F. 2018. Prospective evaluation of rapid point-of-care tests for the diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Vet J.* 237:37–42.
- Truccolo J, Charavay F, Merien F, Perolat P. 2002. Quantitative PCR Assay To Evaluate Ampicillin , Ofloxacin , and Doxycycline for Treatment of Experimental Leptospirosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(3):848–853.
- Vieira ML, Gama-Simões MJ, Collares-Pereira M. 2006. Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis.* 10(5):378–386.
- Ward M, Glickman L, Guptill L. 2002. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada : 677 cases (1970 – 1998). *J Am Vet Med Assoc.* 220(1):53–58.
- Ward M, Guptill L, Prah A, Wu C. 2004. Serovar-specific prevalence and risk factors for leptospirosis among dogs : 90 cases (1997 – 2002). *J Am Vet Med Assoc.* 224(12):1958–1963.
- Ward MP. 2002. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Prev Vet Med.* 56(3):203–213.
- Winzelberg S, Tasse S, Goldstein R, Chapman P, Benedict A, Mason G, Noble S, Curtis K, Chandrashekar R. 2015. Evaluation of SNAP ® Lepto in the Diagnosis of Leptospirosis Infections in dogs : Twenty two Clinical Cases. *Int J Appl Res Vet Med.* 13(3):193–198.
- Wu M, Yang C, Pan M, Chang C, Chen Y. 2004. Reduced renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter activity and inhibited NKCC2 mRNA expression by *Leptospira shermani* : from bed-side to bench. *Nephrol Dial Transplant.* 19(10):2472–2479.
- Zaidi S, Bouam A, Bessas A, Hezil D, Ghaoui H, Ait-Oudhia K, Drancourt M, Bitam I. 2018. Urinary shedding of pathogenic *Leptospira* in stray dogs and cats , Algiers : A prospective study. *PLoS One.* 13(5):1–11.

Zuerner RL, Alt DP. 2009. Variable Nucleotide Tandem-Repeat Analysis Revealing a Unique Group of *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Isolates Associated with California Sea Lions. *J Clin Microbiol.* 47(4):1202–1205.

Anexos

Anexo 1- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson ou do teste exato de Fisher (valores de p).

Tabela 38- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou teste exato de Fisher*, do género, idade, raça, nº de animais, estilo de vida, estatuto vacinal e estação do ano com o diagnóstico.

	Valor de p
Género	0,8921
Idade	0,008236
Raça	0,426*
Nº animais	0,8934
Estilo de vida	0,0647*
Estatuto vacinal	0,054
Estação do ano	0,1114

Tabela 39- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou teste exato de Fisher*, do género, idade, porte, raça, tipo de consulta, estilo de vida e estatuto vacinal com o desfecho.

	Valor de p
Género	0,5042
Idade	0,03518*
Porte	0,8356*
Raça	0,3479
Tipo de consulta	0,576*
Estilo de vida	0,0676*
Estatuto vacinal	0,576*

Tabela 40- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre os sinais clínicos e o desfecho.

Sinais clínicos	Valor de p
Vômito	0,8257
Diarreia	0,0781
Hematúria	0,9123
Hematoquezia	0,1771*
Melena	0,5027*
Hematemese	0,6695*
Petéquias	1*
Epistáxis	0,2364*
Oligoanúria	0,0002884*
Poliúria	1*
Polidipsia	1*
Taquipneia	0,8019
Auscultação pulmonar alterada	0,7049
Tosse	0,6695*
Dispneia	0,1012*
Corrimento ocular	0,611*
Nistagmus	0,4909*
Midríase	0,4909*
Quemose	0,4909*
Hifema	0,4909*
Anorexia	0,4985
Desidratação	0,2681
Mucosas ictéricas	0,3911
Hipotermia	0,0106
Mucosas pálidas	0,3803
TRC≥2"	0,4689
Tremores	0,7049*
Mucosas hiperémicas	0,3516*
Perda de força dos membros posteriores	0,3516*
Corrimento nasal	0,7049*

Tabela 41- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre as alterações no hemograma e o desfecho.

Alterações no hemograma	Valor de p
Leucocitose	0,7756
Neutrofilia	0,8572
Anemia	0,6195
Trombocitopenia	0,6337
Linfopenia	0,7324*
Monocitose	0,9905
Eosinopenia	0,7957

Tabela 42- Resultados do teste exato de Fisher*, entre as alterações no ionograma e o desfecho.

Alterações no ionograma	Valor de p
Hiperfosfatemia	1*
Hiponatremia	1*
Hipocalémia	0,2076*
Hipercalémia	0,4968*
Hipoclorémia	0,1733*

Tabela 43- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre as alterações nas análises bioquímicas e o desfecho.

Alterações nas bioquímicas	Valor de p
Hipoalbuminemia	0,6965*
Hipoproteinemia	0,4891*
Aumento da ALT	0,4817
Aumento da FAS	0,6144
Hiperbilirrubinemia	1*
Aumento da Ureia	0,0861
Aumento da creatinina	0,01623

Tabela 44- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre as alterações na urianálise e o desfecho.

Alterações na urianálise	Valor de p
Proteinúria	1*
Hematúria	0,6027*
Piúria	1*
Glicosúria	0,6332*
Bilirrubinúria	1*
Isostenúria	0,2281*
Hipostenúria	1*
Cilindrúria	0,175*

Tabela 45- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, entre as alterações na ecografia abdominal e o desfecho.

Alterações na ecografia	Valor de p
Alterações na ecografia hepática e/ou da vesícula biliar	0,4286
Alterações na ecografia renal	0,3318

Tabela 46- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre as alterações no raio-X torácico e o desfecho.

	Valor de p
Alterações no raio-X torácico	0,6305
Padrão intersticial não estruturado	0,5956*
Padrão vascular	0,3889*
Padrão interstício-brônquico	1*
Padrão interstício-alveolar	1*
Linfadenomegália supra-esternal	1*
Padrão alveolar	0,3889*
Padrão interstício reticulo-nodular	0,3889*

Tabela 47- Resultados do teste do qui-quadrado de Pearson, ou do teste exato de Fisher*, entre o tratamento realizado e o desfecho.

Tratamento	Valor de p
Ampicilina	0,0066
Doxiciclina	0,0000009
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico	0,7024
Enrofloxacin	0,5607
Metronidazol	0,2955
Furosemida	0,0248
Manitol	0,0515
Vitamina K	1*
Anti-inflamatórios não esteroides	0,1927
Corticoterapia	1*

Anexo 2- Resultados do Log rank test (valor de p), para comparação das curvas de Kaplan-Meier.

Tabela 48- Resultados do Log rank test (valor de p), para comparação das curvas de Kaplan-Meier, de forma a determinar como certos fatores, afetaram a ocorrência de alta, em um dia específico do internamento.

Duração da hospitalização (dias)	Log rank test (valor de p)
Alterações gastrointestinais (sinais clínicos)	0,48
Alterações respiratórias (sinais clínicos)	0,46
Alterações renais (sinais clínicos)	0,11
Desordens hemorrágicas (sinais clínicos)	0,30
Anemia	0,42
Trombocitopenia	0,78
Aumento da creatinina	0,07
Aumento da ureia	0,17
Aumento de pelo menos um parâmetro das bioquímicas hepáticas	0,55
Alterações hepáticas (ecografia)	0,35
Alterações renais (ecografia)	0,44
Alterações na radiografia torácica	0,50
Doxiciclina	0,09
Ampicilina	0,50

Anexo 3- Valores de p obtidos no teste da normalidade de Shapiro-Wilk, teste Wilcoxon (teste não paramétrico) e t-test para duas amostras independentes (teste paramétrico), para os valores absolutos do hemograma, ionograma e bioquímicas com o desfecho.

Tabela 49- Valores de p obtidos no teste da normalidade de Shapiro-Wilk

	Valor de p
Leucócitos	0,00008
Neutrófilos segmentados	0,0002
Hematócrito	0,322
Plaquetas	0,018
Linfócitos	0,00001
Sódio	0,006
Fosforo	0,099
Potássio	0,914
Cloro	0,202
Albumina	0,00002
Proteínas totais	0,00003
ALT	4,876e-10
AST	0,003
FAZ	0,00000002
Bilirrubina total	0,257
Ureia	0,00002
Creatinina	0,0001

Tabela 50- Valores de p obtidos no teste Wilcoxon

Desfecho	Valor de p
Leucócitos	0,7273
Neutrófilos segmentados	0,2918
Plaquetas	0,1883
Linfócitos	0,8855
Sódio	0,3296
Albumina	0,3318
Proteínas totais	0,2206
ALT	0,1868
AST	1
FAZ	0,6628
Ureia	0,01041
Creatinina	0,003

Tabela 51- Valores de p obtidos no t-test para duas amostras independentes

Desfecho	Valor de p
Hematócrito	0,5973
Fósforo	0,3691
Potássio	0,06506
Cloro	0,8479
Bilirrubina total	0,8967